



**Daniel Filipe  
Ribeiro Teixeira**

**Determinação de compostos sulfurosos voláteis no  
vinho**





**Daniel Filipe  
Ribeiro Teixeira**

**Determinação de compostos sulfurosos voláteis no  
vinho**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho aos meus pais por todo o amor, carinho, apoio e também pela educação e oportunidades que sempre me deram.



## **o júri**

presidente

**Professor Doutor Artur Manuel Soares da Silva**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes**  
Professora Associada da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar**  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa





## **Agradecimentos**

Este trabalho deve em muito ao contributo de inúmeras pessoas que ao longo da minha vida académica me ajudaram a superar as dificuldades encontradas neste percurso.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Maria Teresa Gomes pelos conselhos, ensinamentos e por todo o encorajamento sem os quais não seria possível concluir este trabalho.

Um muito obrigado também a todos os colegas de laboratório e do Departamento de Química, em especial ao Doutor Daniel Fernandes por toda a sua paciência, ajuda e partilha de conhecimentos.

À Ângela Rito por sempre acreditar nas minhas capacidades e por nunca me deixar desistir perante qualquer adversidade.

Um agradecimento a todos os meus amigos pelos bons momentos, pelas conversas e sorrisos.

Um obrigado especial à Elisabete Maciel pelo apoio, motivação e carinho.

À minha família, em especial aos meus padrinhos pelo amparo e incentivo; aos meus avós por toda a ternura e ensinamentos sobre a vida; e à minha irmã por todo o aconchego e meiguice que a tornam tão especial.



## Palavras-chave

Microbalanças de cristais de quartzo, trietanolamina, compostos sulfurosos voláteis, vinho, pré-concentração

## Resumo

Com o presente trabalho pretendeu-se detectar os teores de sulfureto de hidrogénio e de etanotiol no vinho. Estes compostos apresentam maus odores e degradam a qualidade do mesmo.

Para quantificar o teor destes compostos foi utilizada uma microbalança de cristais de quartzo. Os cristais utilizados eram de 9 MHz com eléctrodos de ouro. Os ensaios foram realizados com cristais não revestidos ou revestidos com trietanolamina.

Devido a baixa concentração dos compostos, foi necessária a utilização de colunas de pré-concentração de peneiros moleculares do tipo 5A e com carvão activado.

A metodologia de pré-concentração dos compostos foi optimizada, embora a sua aplicação em amostras de vinho não ter sido conseguida devido ao elevado teor de água no sistema, tendo por isso ainda que ser melhorado toda a parte de secagem.

Para o etanotiol foi utilizado um sensor com um cristal não revestido. O limite de detecção obtido foi de 557  $\mu\text{g}$  e uma gama linear de calibração entre 229 e 2600  $\mu\text{g}$ . A sensibilidade do sensor foi de 3,19 Hz/mg. A pré-concentração deste composto é eficiente, no entanto as percentagens de recuperação foram superiores a 100% para todos os ensaios. Aplicando um teste de significância conclui-se que a concentração obtida na análise é significativamente diferente do valor real ( $\alpha=0,05$ ). Os limites de detecção calculados para o tiol estão longe dos mínimos necessários para a utilização do vinho como amostra, sendo neste caso imprescindível melhorar o limite de detecção do método.

Para a análise do sulfureto de hidrogénio o sensor utilizado continha um cristal revestido com trietanolamina e foi atingido o limite de detecção de 1,9  $\mu\text{g}$ , a gama linear de 2,47 a 74,1  $\mu\text{g}$  e a sensibilidade do sensor foi de 0,69 Hz/ $\mu\text{g}$ . A pré-concentração deste composto altera a gama linear de resposta do sensor e foi possível observar respostas para o teor apresentado pelo vinho com odores redutores.

O principal interferente nesta metodologia é a água e é necessário avaliar a adequabilidade do sensor e do método de pré-concentração injectando amostras de vinho.



**Keywords**

Quartz crystal microbalance, triethanolamine, volatile sulphur compounds, preconcentration

**Abstract**

The aim of this work was the detection of contents of hydrogen sulphide and ethanethiol in wine. These compounds present bad odours and degrade the quality of wine.

A quartz crystal microbalance was used to quantify these compounds. The piezoelectric quartz crystals used were 9 MHz with gold electrodes. The assays were performed with one uncoated crystal or a crystal coated with triethanolamine.

Due to the low concentration of the compounds it was necessary to use preconcentration columns with molecular sieves 5A and activated carbon.

The methodologies for the preconcentration of the compounds were optimized, although in to wine samples was not successful. Further improvement in the drying system is needed due to the high water levels in the system.

For ethanethiol a sensor with an uncoated quartz crystal was used. Detection limit for ethanethiol was 557  $\mu\text{g}$  and the linear calibration range extended from 229 to 2600  $\mu\text{g}$ . The sensitivity of the sensor was 3.19 Hz/mg. The preconcentration of this compound is effective, but recovery rates were above 100% for all tests. Applying a significance test was concluded that concentration obtained in the analysis was significantly different from the actual value ( $\alpha=0.05$ ). The detection limits calculated for the thiol were far from the minimum necessary for the wine analysis therefore, were an improvement in the detection limit of the method is mandatory.

For the analysis of hydrogen sulphide a sensor with a crystal coated with triethanolamine was used. The detection limit achieved was 1.9  $\mu\text{g}$ , and the linear calibration range extended from 2.47 to 74.1  $\mu\text{g}$ . Sensitivity of this sensor was 0.69 Hz/ $\mu\text{g}$ . The preconcentration of this compound changed the linear response range of the sensor and it was possible to observe a response to a quantity corresponding to the usual levels presented in wine with reducing odours.

The major interference in this methodology is water and it is necessary to evaluate the adequacy of sensor and preconcentration method before injecting samples of wine.



## Abreviaturas

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

DAP: Fosfato de diamónio

EtSH: Etanotiol

EtSEt: Sulfureto de dietilo

EtSSEt: Disulfureto de dietilo

GC-AED: Detector de emissão atómica

GC-FPD: Detector fotométrico de chama

GC-NCI-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com ionização química negativa

GC-PFPD: Cromatografia gasosa acoplada ao detector fotométrico de chama pulsada

GC-SCD: Detector por quimioluminescência de enxofre

MS: Peneiros moleculares

OIV: Organização internacional da vinha e do vinho

Pi: Fosfato inorgânico

PVC: Cloreto de polivinilo

QCM: microbalanças de cristais de quartzo

SPME: Micro-extracção em fase sólida

TEA: Trietanolamina

TMAF: Fluoreto de tetrametilamónio tetrahidratado

VSC: Compostos sulfurosos voláteis

$\Delta F$ : Variação de frequência





# Índice

Abreviaturas .....	XV
Índice de Figuras.....	XXI
Índice de Tabelas .....	XXIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. O VINHO .....	5
2.1 A história do vinho .....	7
2.2 Vinificação .....	7
2.2.1 Colheita .....	8
2.2.2 Esmagamento.....	8
2.2.3 Fermentação .....	8
2.2.3.1 Fermentação Alcoólica.....	9
2.2.3.2 Fermentação Maloláctica.....	9
2.2.4 Estabilização, Filtração e Engarrafamento .....	10
3. DERIVADOS DE ENXOFRE.....	11
3.1 Origem .....	13
3.2 Compostos sulfurosos voláteis (VSC) .....	13
3.2.1 VSC Leves .....	14
3.3 Formação de H <sub>2</sub> S e EtSH .....	15
3.3.1 Formação de H <sub>2</sub> S.....	15
3.3.2 Formação de EtSH.....	17
3.4 Eliminação de H <sub>2</sub> S e EtSH .....	18
4. SENSORES DE MASSA .....	21
4.1 Sensores Químicos.....	23
4.2 Piezoelectricidade .....	23
4.3 Cristais piezoelétricos de quartzo .....	25
4.4 Microbalança de cristais de quartzo (QCM) .....	26
4.5 Critérios para escolha do revestimento e aplicação .....	26
4.6 Vantagens e desvantagens da QCM .....	27
5. MÉTODOS DE DETECÇÃO PARA H <sub>2</sub> S E EtSH .....	29
5.1 Metodologias de quantificação convencionais .....	31
5.2 Metodologias de quantificação baseadas em microbalanças de cristais de quartzo .....	32
5.3 Análise de H <sub>2</sub> S e EtSH no Vinho por QCM: estado da arte .....	32
5.3.1 Introdução.....	32
5.3.2 Análise de H <sub>2</sub> S em vinho sintético.....	33

5.3.3	Análise de EtSH em vinho sintético .....	34
5.3.4	Sensor único para H <sub>2</sub> S e EtSH em vinho sintético.....	35
5.3.5	Sensor único para H <sub>2</sub> S e EtSH em amostras reais .....	36
5.4	Pré-concentração e análise de H <sub>2</sub> S por QCM: Estado da arte .....	36
5.4.1	Introdução.....	36
5.4.2	Sistema Experimental .....	37
5.4.3	Análise de H <sub>2</sub> S de amostras de hálito.....	38
5.5	Virtudes e problemas das metodologias existentes e a sua aplicabilidade ao presente trabalho .....	39
6.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E INSTRUMENTAÇÃO .....	41
6.1	Reagentes .....	43
6.2	Escolha e aplicação do revestimento.....	43
6.3	Produção de gases .....	44
6.3.1	Padronização de H <sub>2</sub> S .....	46
6.4	Preparação de padrões de EtSH .....	47
6.5	Medição de Caudais .....	48
6.6	Dispositivos de aquecimento e arrefecimento .....	49
6.7	Preparação de amostras de vinho sintético .....	51
6.8	Injecção dos padrões de EtSH, H <sub>2</sub> S e amostras de vinho.....	52
7.	NOVAS METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE H <sub>2</sub> S E EtSH.....	55
7.1	Análise de H <sub>2</sub> S e EtSH em amostra de vinho sintético com um único sensor para tióis (cristal não revestido) .....	57
7.1.1	Introdução.....	57
7.1.2	Equipamento.....	58
7.1.3	Procedimento experimental .....	59
7.1.3.1	Procedimento para recta de calibração de EtSH .....	59
7.1.3.2	Procedimento para recta de calibração para H <sub>2</sub> S .....	60
7.1.3.3	Procedimento para análise das amostras.....	60
7.1.4	Resultados e Discussão .....	60
7.1.5	Conclusão .....	62
7.2	Análise de H <sub>2</sub> S e EtSH presente no vinho com um único sensor (cristal revestido com TEA) .....	62
7.2.1	Introdução.....	62
7.2.2	Equipamento.....	63
7.2.3	Procedimento Experimental .....	64
7.2.4	Resultados e Discussão .....	65
7.2.5	Conclusão .....	67
7.3	Análise de H <sub>2</sub> S e EtSH em amostras de vinho sintético com dois sensores em série .....	67
7.3.1	Introdução.....	67

7.3.2 Equipamento .....	68
7.3.3 Procedimento Experimental .....	70
7.3.4 Resultados e Discussão .....	70
7.3.5 Teste à eficiência da pré-concentração do H <sub>2</sub> S e EtSH .....	72
7.3.5.1 Introdução .....	72
7.3.5.2 Sensor para EtSH .....	73
7.3.5.2.1 Equipamento .....	73
7.3.5.2.2 Procedimento Experimental .....	74
7.3.5.2.3 Resultados e Discussão .....	74
7.3.5.3 Sensor para H <sub>2</sub> S .....	75
7.3.5.3.1 Equipamento .....	75
7.3.5.3.2 Procedimento Experimental .....	76
7.3.5.3.3 Resultados e Discussão .....	77
7.3.6 Conclusões .....	79
8. CONCLUSÃO .....	81
9. BIBLIOGRAFIA .....	85



# Índice de Figuras

Figura 1- Reacção da fermentação maloláctica .....	9
Figura 2- Formação de $H_2S$ e tióis .....	16
Figura 3- Formação EtSH a partir do etanol, etanal e do éster S-etílico.....	17
Figura 4- Degradação de $H_2S$ por bactérias verde sulfurosas .....	18
Figura 5- Eliminação de $H_2S$ com sulfato de cádmio.....	18
Figura 6- Mecanismo da formação da casse cúprica.....	19
Figura 7- Representação da onda que se propaga através do material, perpendicularmente as faces do cristal de quartzo [39] .....	24
Figura 8- Cristal piezoeléctrico de quartzo com eléctrodos [39].....	25
Figura 9- Estrutura cristalina do quartzo com representação dos eixos coordenados e os vários cortes possíveis [39] ..	26
Figura 10- Esquema do sistema usado na determinação de $H_2S$ : 1/7-Rotâmetro, 2-Porta de injeção, 3-Serpentina, 4- Célula para vinho, 5-Caixa com membrana de nafion e agentes secantes 3ª, 6-Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 8- Oscilador, 9-Fonte de alimentação, 10- Célula do cristal, 11- Freqüencímetro, 12- PC para aquisição de dados [39] .....	33
Figura 11- Forma do sinal analítico após injeção de um padrão de $H_2S$ (4).....	34
Figura 12- Esquema do sistema usado na determinação do EtSH no vinho sintético: 1-Rotâmetro, 2/3 Célula para vinho, 4-Celula com agentes secantes; 5-Célula do cristal, 6-Fonte de alimentação, 7-Oscilador, 8-freqüencímetro [39] .....	34
Figura 13- Forma do sinal analítico após injeção de um padrão líquido de EtSH [39] .....	35
Figura 14- Forma dos sinais analíticos após alcalinização e acidificação da amostra [39].....	36
Figura 15- Sistema experimental com células de PVC e com unidade de pré-concentração para a análise de $H_2S$ no ar expirado: a) rotâmetro, b) Unidade de pré-concentração, c) membrana de nafion, d)Célula de PVC, e) fonte de alimentação, f) oscilador com circuito divisor, g) computador com sistema de aquisição PXL-6608 [55].....	37
Figura 16- Sistema de injeção e unidade de pré-concentração com indicação da direcção dos gases nos vários passos da análise: a) pré-concentração, b) dessorção e análise, c) eliminação da água e regeneração da coluna [55] .....	38
Figura 17- Método de aplicação do revestimento por spray (adaptado de [44]) .....	44
Figura 18- Montagem geral para produção de gases: 1-Placa de agitação, 2-Célula de reacção, 3-Funil de carga, 4- Célula de secagem, 5-Pêra de amostragem, 6-Célula de retenção, 7-Borbulhador .....	45
Figura 19- Reacções químicas de formação de gases .....	45
Figura 20- Método de preparação do saco de diluição para $H_2S$ .....	46
Figura 21- Equações químicas das reacções ocorridas na titulação para a padronização do $H_2S$ (a e b) e para a padronização do tiosulfato (b e c). .....	47
Figura 22- Montagem para medição de caudal .....	48
Figura 23- Representação de um módulo e do efeito termoeléctrico [60].....	49
Figura 24- Módulos e dissipador de calor .....	50
Figura 25- Dispositivo de Peltier e refrigeração da coluna de pré-concentração .....	51
Figura 26- Dispositivo Peltier e de aquecimento .....	51
Figura 27- Mecanismo de injeção de padrões de EtSH com bureta automática .....	53

Figura 28- Reacções de substituição com metanol e ciclohexanol .....	58
Figura 29- Montagem experimental para síntese e quantificação de tióis: 1-Rotâmetro, 2-Porta de injeção de padrões gasosos, 3-Porta de injeção de padrões líquidos, 4-Célula de vinho, 5-Célula de reação, 6- Célula com agentes secantes, 7-Célula de PVC do cristal, 8-Oscilador, 9-Fonte de alimentação, 10-Frequencímetro.....	59
Figura 30- Recta de calibração para EtSH .....	61
Figura 31- Montagem para pré-concentração e quantificação de H <sub>2</sub> S e EtSH. 1- Rotâmetro, 2- Porta de injeção de gases, 3- Porta de injeção de líquidos, 4- Célula de vinho, 5-Caixa com membrana de Nafion e secantes, 6- Coluna de pré-concentração de EtSH, 7- Dispositivo Peltier, 8- Coluna de pré-concentração de H <sub>2</sub> S, 9- Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 10- Célula de PVC com cristal, 11-Oscilador, 12- Fonte de alimentação de 5V, 13-Frequencímetro, 14- PC para aquisição de dados .....	64
Figura 32- Recta de calibração para EtSH .....	66
Figura 33- Montagem experimental com dois sensores em série: 1- Rotâmetro, 2- Porta de injeção para gases, 3- Porta de injeção para líquidos, 4- Célula de vinho, 5- Caixa com membrana de Nafion, 6- Coluna de pré-concentração com MS-5A, 7- Sensor 1, 8- Colunas de carvão activado, 9- Dispositivo Peltier, 10- Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 11- Sensor 2, 12- Placa para distribuição de voltagem, 13- Painei BNC 2121, 14- Counter/Timer Device PXI-6608, 15- Fonte de 9V, 16- Regulador de voltagem, 17- PC.....	69
Figura 34- Recta de calibração para EtSH .....	71
Figura 35- Montagem experimental para quantificação de EtSH: 1- Rotâmetro, 2- Célula com agentes peneiros, 3- Porta de injeção para líquidos, 4- Caixa com membrana de Nafion, 5- Coluna de pré-concentração com MS-5A, 6- Sensor 1, 7- Bureta automática, 8- Painei BNC 2121, 9- Counter/Timer Device PXI-6608, 10- PC, 11- Regulador de voltagem, 12- Fonte de 9V.....	73
Figura 36- recta de calibração para EtSH .....	74
Figura 37- Rotâmetro, 2-Celula de secagem, 3- Porta de injeção de gases, 4- Caixa com membrana de Nafion, 5- Coluna de pré-concentração com carvão activado, 7- Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 8- Sensor, 9- Dispositivo de Peltier, 10- Counter/Timer Device PXI-6608, 11- Painei BNC 2121, 12- PC, 13- Regulador de voltagem, 12- Fonte de 9V.....	76
Figura 38- Recta de calibração para H <sub>2</sub> S.....	77
Figura 39- Forma do sinal analítico para detecção de H <sub>2</sub> S (cerca de 20 µg) usando pré-concentração.....	78
Figura 40- Forma do sinal analítico para detecção de H <sub>2</sub> S (164 ng) usando pré-concentração .....	79

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Concentração média dos VSC responsáveis por odores de redução (adaptado de [3]) .....	15
Tabela 2- Percentagem de recuperação nos testes de pré-concentração .....	75
Tabela 3- Respostas a uma injeção de 164ng de H <sub>2</sub> S .....	79





## 1. INTRODUÇÃO

---



O vinho é desde há vários séculos um produto mundialmente apreciado. Existem diversos tipos de vinho, sendo Portugal um país de excelência na sua produção [1, 2].

A vinificação é a fase onde se definem as características organolépticas que um vinho apresenta, e como é natural também são produzidos compostos, durante este processo, que transmitem maus odores ao vinho, como os derivados de enxofre [3]. Os conhecimentos actuais permitem a diminuição destes odores no vinho, proporcionando um produto de qualidade superior.

Os compostos de enxofre mais problemáticos no vinho são o sulfureto de hidrogénio ( $H_2S$ ) e o etanotiol ( $EtSH$ ), que mesmo existindo em baixas concentrações, degradam a qualidade deste produto pois o seu limite de percepção é muito baixo [4, 5], e para os eliminar é necessário a adição de cobre, que reage com o enxofre e cria um complexo que ao precipitar minimiza os maus aromas [6-8].

O cobre existe naturalmente no vinho, mas não em quantidade suficiente para reagir com os compostos de enxofre e precisa de ser adicionado, embora em elevadas quantidades, este composto possa originar fenómenos de casse cúprica ou fêrrica, ou seja formam-se precipitados contendo cobre ou ferro o que degrada as propriedades organolépticas do vinho. Isto é ainda mais preocupante se ocorrer no vinho pós-engarrafado. Os prejuízos poderão ser avultados e a tentar corrigir um problema cria-se um ainda maior [9].

O  $H_2S$  pode também ser eliminado recorrendo apenas a agitação, no entanto este processo origina a formação de outros compostos de enxofre de remoção problemática [7].

As técnicas disponíveis para identificar estes compostos são pouco eficientes, morosas e de difícil aplicação [10]. Este trabalho tem como objectivo definir um procedimento para detectar o teor destes compostos no vinho comercial, utilizando uma microbalança de cristais de quartzo. Pretende-se que a técnica seja de simples aplicação, rápida, barata e reprodutível.



## 2. O VINHO

---



## 2.1 A história do vinho

A origem do vinho não é clara mas os primeiros registos do cultivo e produção de vinho remontam à época do antigo Egipto, onde era consumido apenas pelos faraós e classe nobre, representava um papel importante em rituais religiosos. Posteriormente, na Grécia, o vinho desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento da região, e também de outros territórios, tais como a Itália, Sicília e Marselha, onde os gregos cultivaram videira para produção de vinho, que teve uma importância vital na economia e nos hábitos dos povos do mediterrâneo, que começaram a emergir do barbarismo quando aprenderam a cultivar não só a videira, mas também a oliveira (Tucídides, historiador da Grécia antiga). Este povo realizava cultos a Dionísio, Deus mitológico das belas-artes, do teatro e do vinho [1, 2].

No entanto, a real difusão do vinho dá-se com a expansão do império romano pelo mediterrâneo, onde as maiores e melhores regiões de vinho foram criadas e permaneceram até aos dias de hoje [1].

A enologia começa a ser encarada como ciência, tornando-se fundamental o desenvolvimento de técnicas de cultivo, criação de diferentes variedades de uva, sofisticação de meios de armazenamento e transporte do vinho e começam a ser usadas as primeiras garrafas [11].

Similarmente aos gregos, os romanos veneravam o Deus Baco, Deus correspondente a Dionísio, na mitologia romana. O vinho torna-se nesta altura um produto do povo e são até inauguradas as primeiras tabernas. Com a propagação do vinho pela Europa, este torna-se parte da dieta diária dos europeus, numa altura em que a água consumida não era de confiança, sendo o vinho a bebida favorita para acompanhar as refeições [1, 11].

Nos últimos 150 anos, com a evolução tecnológica, o fabrico de vinho é revolucionado e o estudo, não só do produto final, mas de todos os passos de produção, permitiram o controlo das várias etapas de fabrico e proporcionaram o aperfeiçoamento de vinhos de elevada qualidade [11].

## 2.2 Vinificação

A vinificação é o processo que transforma a uva em vinho, mas a produção do vinho começa muito antes da colheita da uva. À semelhança de todos os outros

organismos vegetais, a videira necessita de água, luz e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para realizar a fotossíntese e gerar açúcares necessários para o sustento da planta que, no caso concreto, é em grande parte armazenado na uva sendo essencial para o fabrico de vinho [12]. O tipo de vinho a ser produzido varia segundo a região de cultivo, o tipo de solo e a casta utilizada [13]. Para aumentar a qualidade das uvas e controlar a quantidade de açúcar presente nestas, os produtores devem previamente preparar o solo e a videira, averiguar a adequada irrigação da planta, a eventual presença de pragas e o uso de pesticidas, herbicidas ou fertilizantes. Todos estes parâmetros reflectem-se na composição do fruto e consequentemente na quantidade e qualidade do vinho produzido [5, 14].

### **2.2.1 Colheita**

O momento da colheita é relevante para o tipo de vinho que se pretende fabricar. Se a vindima se realizar prematuramente, o vinho terá características mais ácidas e com menor teor alcoólico, pelo contrário, se a colheita for tardia existe maior teor de açúcares o que proporciona um vinho rico em álcool mas com menor acidez [1].

### **2.2.2 Esmagamento**

Este processo tem diversas variações, permitindo o esmagamento a diferentes velocidades e triturar apenas os componentes da uva que se pretendem. Este processo tem como principal objectivo o romper do bago libertando o mosto, que em contacto com o ar e na presença das leveduras permite o início da fermentação. A interacção entre a parte sólida e o mosto também possibilita a dissolução do tanino e da matéria corante. O esmagamento demasiado vigoroso provoca a trituração das partes sólidas das uvas, que origina um excessivo gosto herbáceo [8, 15].

### **2.2.3 Fermentação**

Durante a fermentação ocorrem diversas reacções químicas onde se formam diversos compostos que definem as principais características do vinho. O principal produto formado é o etanol mas também é gerado  $\text{CO}_2$  que impulsiona a fase sólida da mistura para a superfície. Este fenómeno de ascensão dos sólidos deve ser evitado pelos produtores para que seja absorvido o máximo de taninos, cor e sabor [1].



A fermentação deve efectuar-se a uma temperatura máxima de 30°C para manter a viabilidade das leveduras que realizam este processo.

Existem 2 tipos de fermentação na produção de vinho: alcoólica e maloláctica.

### 2.2.3.1 Fermentação Alcoólica

Esta fermentação deve ser iniciada rapidamente para que não haja oxidação do mosto. A partir da glicose e frutose dá-se a glicólise com a formação de piruvato, que é utilizado pela enzima piruvato descarboxilase presente nas leveduras e forma-se CO<sub>2</sub> e acetaldeído que é reduzido a etanol através da álcool desidrogenase e produz-se ATP necessário para as reacções metabólicas. A reacção global da fermentação alcoólica é



Para além destes dois compostos formam-se outros produtos secundários tais como: glicerina, ácidos voláteis, outros álcoois, ésteres, H<sub>2</sub>S entre outros, que são compostos preponderantes nas características organolépticas do produto final [8, 12, 16].

Uma fermentação lenta origina demasiados produtos secundários o que provoca gostos grosseiros, demasiada acidez e outros maus odores e paladares. Por outro lado, a fermentação rápida provoca a perda de aromas pela libertação exagerada de CO<sub>2</sub>.

Este processo pode ser atrasado ou interrompido com a adição de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), dependendo do equilíbrio álcool-açúcar que o produtor pretende [8, 17].

### 2.2.3.2 Fermentação Maloláctica

Esta fermentação consiste na degradação do ácido málico a láctico e dióxido de carbono, realizada por bactérias lácticas [18], como descrito na Figura 1.

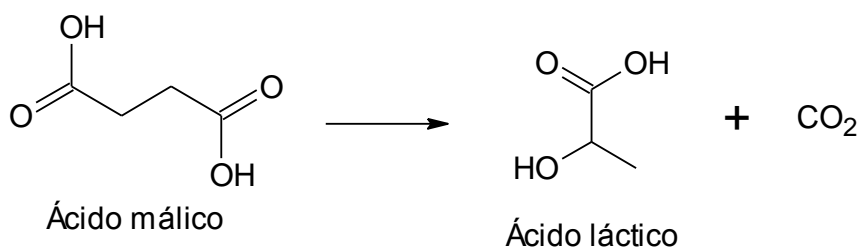


Figura 1- Reacção da fermentação maloláctica

Esta fermentação pode iniciar-se no período final da fermentação alcoólica, ou após o seu fim e tem os seguintes efeitos sobre os vinhos [19, 20]:

- Redução de acidez, pois o ácido málico é mais agressivo que o ácido láctico
- Estabilização do vinho assegurando que este processo não ocorre no vinho engarrafado onde se produz gás com sabor desagradável
- Potencia os aromas do vinho

#### **2.2.4 Estabilização, Filtração e Engarrafamento**

No fim da fermentação as bactérias, leveduras, resíduos sólidos e matéria orgânica ficam depositados no fundo do tanque. Esses organismos ou compostos devem ser removidos para que não sejam transferidos sabores e aromas indesejados para o vinho. Para tal, realiza-se primeiramente uma decantação, ou seja, transfere-se a fase líquida para outro recipiente, eliminando o precipitado. Esse recipiente deve ser constantemente vigiado para que haja a garantia que se encontra totalmente preenchido, pois há diminuição de volume devido à libertação de gases e à diminuição da temperatura. Se o nível não for constantemente corrigido, pode ocorrer a oxidação do vinho e a sua consequente degradação. Alguns vinhos podem eventualmente sofrer uma pasteurização, que além eliminar com as restantes bactérias, promove a precipitação de proteínas. Podem ser realizadas várias decantações sendo que antes da última, ou mesmo antes do engarrafamento, procede-se a uma estabilização tartárica que provoca a precipitação dos sais, principalmente o bitartarato de potássio que não é prejudicial mas pode precipitar naturalmente no vinho já engarrafado o que arruína a sua apresentação ao consumidor [17].

Também antes do engarrafamento ou do armazenamento em pipas, o vinho é filtrado para remover as partículas em suspensão para que fique com uma tonalidade límpida [1].

O vinho é um meio reaccional muito activo, e no período de envelhecimento pode sofrer várias modificações, que regra geral contribuem para incrementar a qualidade do produto final. Antes do engarrafamento, dependendo do tipo de vinho que se pretende produzir, pode ainda passar por algumas correcções tais como: alteração de pH ou da cor, bem como a adição de CO<sub>2</sub> [8].

### 3. DERIVADOS DE ENXOFRE

---



### 3.1 Origem

Durante a fermentação alcoólica do vinho, as leveduras formam compostos de enxofre através de mecanismos bioquímicos complexos. Estes compostos são muito voláteis e provocam maus odores no vinho. Os produtores estão plenamente conscientes do risco que podem causar estes odores desagradáveis e consequentemente da necessidade de técnicas que previnam a formação destes compostos, ou de conhecer a sua concentração exacta para os eliminarem posteriormente com a adição de cobre [1, 4, 16, 19, 21], assunto que será discutido posteriormente.

Os compostos de enxofre podem ter origem, ou ser potenciados por:

- Resíduos provenientes do tratamento das videiras
- Estirpe de levedura
- Deficiência de azoto
- Deficiência de outros nutrientes
- Fermentação a temperaturas elevadas
- Arejamento inadequado durante a fermentação
- Demasiado tempo em contacto com as borras

Alguns compostos de enxofre contribuem positivamente para o odor dos vinhos, mas na sua maioria apresentam maus aromas com limites de detecção muito baixos, alguns abaixo de 1 µg/L [4]. Estes compostos eram designados de mercaptanos, devido à precipitação a que eram sujeitos na presença de sais de mercúrio. Em 1965 a nomenclatura IUPAC foi revista, e os mercaptanos são desde então designados como tióis. Os maus aromas dos vinhos estão normalmente associado a este grupo e a sua formação será referida na secção 3.3 [12, 22, 23].

### 3.2 Compostos sulfurosos voláteis (VSC)

Existem diversos mecanismos bioquímicos que explicam a complexa formação de compostos de enxofre por parte das leveduras, sendo alguns deles contraditórios [10]. Portanto a generalidade dos produtores não usam medidas preventivas para minimizar o aparecimento destes odores reduzidos.

Estes compostos de enxofre estão divididos em 2 classes: leves (ponto de ebulição menor que 90°C) ou pesados (ponto de ebulição superior a 90°C) [4]. A maioria destes

compostos pesados presentes no vinho não foram alvo de estudos aprofundados por diversos motivos [16, 24], como por exemplo:

- São compostos que, ao contrário dos leves, aparecem em maior quantidade depois da fermentação alcoólica e a sua concentração não se altera posteriormente;
- Limite de percepção elevados (comparativamente aos leves);
- Poucos induzem odores desagradáveis ao vinho;
- Não reagem com o cobre;

É também importante referir que alguns destes compostos apresentam características organolépticas favoráveis, como é caso do 3-mercaptopentanol, 4-mercaptopentano-2-ona e acetato de 3-mercaptopentilo encontrados principalmente em vinhos brancos da casta Sauvignon Blanc [6, 16, 25].

Por não serem compostos, que regra geral, afectem o aroma do vinho negativamente, o estudo irá cingir-se aos compostos leves.

### **3.2.1 VSC Leves**

Os compostos sulfurosos voláteis leves apresentam odores particularmente desagradáveis, mesmo em concentrações muito pequenas, devido ao limite de percepção baixo [1, 8, 21, 25].

Na Tabela 1 apresentam-se os principais compostos leves presentes no vinho, o limite de percepção, o odor, a concentração média em vinhos tratados e não tratados e o ponto de ebulição.

Tabela 1- Concentração media dos VSC responsáveis por odores de redução (adaptado de [3])

Substância	Fórmula molecular	Limite de percepção (µg/l)	Odor	Concentração vinhos limpos (µg/l)	Concentração em vinhos com odores redutores (µg/l)	Ponto de ebulição (°C)
Sulfureto de hidrogénio	H <sub>2</sub> S	0,8	Ovos podres	0,3	16,3	-61
Metanotiol	CH <sub>3</sub> SH	0,3	Água estagnada	0,7	5,1	6
Etanotiol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> SH	0,1	Gás	0	10,8	35
Sulfureto de dimetilo	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	5	Marmelo	1,4	2	35

No trabalho prático proposto, serão apenas considerados o EtSH e o H<sub>2</sub>S pois encontram-se em maiores concentrações nos vinhos com odores redutores, possuem aromas mais intensos, baixos limites de percepção e, por reagirem com o cobre, é importante ter conhecimento da sua concentração exacta para que se conheça a quantidade de cobre a adicionar ao vinho, para que os referidos compostos sejam eliminados [16]. A terminologia vinhos limpos refere-se a vinhos que foram tratados para se reduzir ou eliminar totalmente os VSC, enquanto os vinhos com odores redutores ou de redução não sofrem qualquer tipo de tratamento, e são as matrizes ideais para o caso em estudo [4].

No final da fermentação, as quantidades de H<sub>2</sub>S e EtSH são muito superiores as que existem no vinho. A concentração de H<sub>2</sub>S no final da fermentação é em média de 1000 µg/L enquanto o EtSH é de cerca de 30 µg/L [19]. Estes compostos podem ser transformados em outros compostos ou perdem-se durante a os diversos passos da vinificação apos o final da fermentação devido a sua elevada volatilidade.

### 3.3 Formação de H<sub>2</sub>S e EtSH

#### 3.3.1 Formação de H<sub>2</sub>S

O H<sub>2</sub>S é directamente produzido pelo metabolismo das leveduras, durante a fermentação alcoólica [4, 21, 25]. A sua formação acontece durante a biossíntese de

alguns aminoácidos sulfurosos, ou pela sua degradação de compostos sulfatados controlada por enzimas responsáveis pela sua redução, como por exemplo a cisteína-desulfatase, como referido na Figura 2 [3, 8].

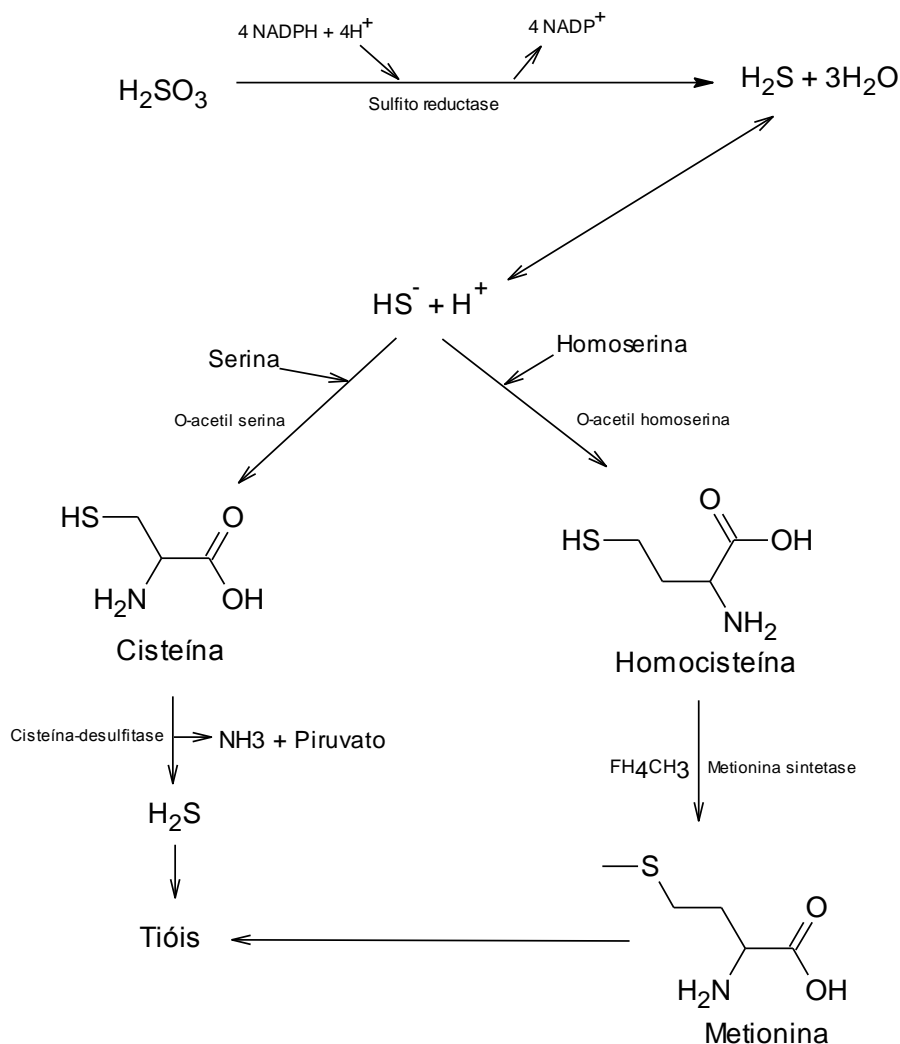


Figura 2- Formação de  $\text{H}_2\text{S}$  e tióis

A concentração anormalmente elevada de  $\text{H}_2\text{S}$  pode dever-se à insuficiência de azoto no mosto. As leveduras obtêm energia através de transferência de electrões preferencialmente para o azoto, formando assim  $\text{N}_2$ . Na falta de azoto, existem mecanismos que possibilitam a transferência de electrões para os grupos sulfato formando  $\text{H}_2\text{S}$  ou ainda para o  $\text{CO}_2$  formando metano ( $\text{CH}_4$ ) [12]. Durante a fermentação pode também existir a quebra do enxofre existente nos aminoácidos e a libertação de  $\text{H}_2\text{S}$  ou tióis [5, 26] (Figura 2). Este mecanismo de degradação de aminoácidos também



provoca a libertação do azoto dos aminoácidos para que possa ser usado pelas leveduras [4].

Outros factores podem influenciar a quantidade de  $\text{H}_2\text{S}$  formado, tais como [3-5]:

- Quantidade e tipo de compostos de enxofre presentes na uva e nas restantes partes sólidas;
- Estirpes de leveduras presente e as condições fisiológicas durante a fermentação alcoólica;
- Química do vinho: pH, teor de vitamina B6, pantotenato, sulfitos, sulfatos e a concentração de etanol;
- Resistência a oxidação do vinho e do mosto;
- Parâmetros físicos tais como os sólidos suspensos ou a temperatura da fermentação.

### 3.3.2 Formação de EtSH

Este composto é mais persistente no vinho devido à sua menor volatilidade. É um composto que tem um baixo limite de percepção e pode ainda originar compostos de difícil remoção tais como o sulfureto de dietilo ( $\text{EtSEt}$ ) ou o disulfureto de dietilo ( $\text{EtSSEt}$ ). O mecanismo de formação não é claro, mas pelo que se conhece pode ocorrer de três formas distintas: reacção entre  $\text{H}_2\text{S}$  directamente com o etanol, reacção do  $\text{H}_2\text{S}$  com o etanal com formação de um intermediário, ou ainda através da redução do éster S-etílico do ácido tioacético, exemplificado na Figura 3 [6, 19, 25].

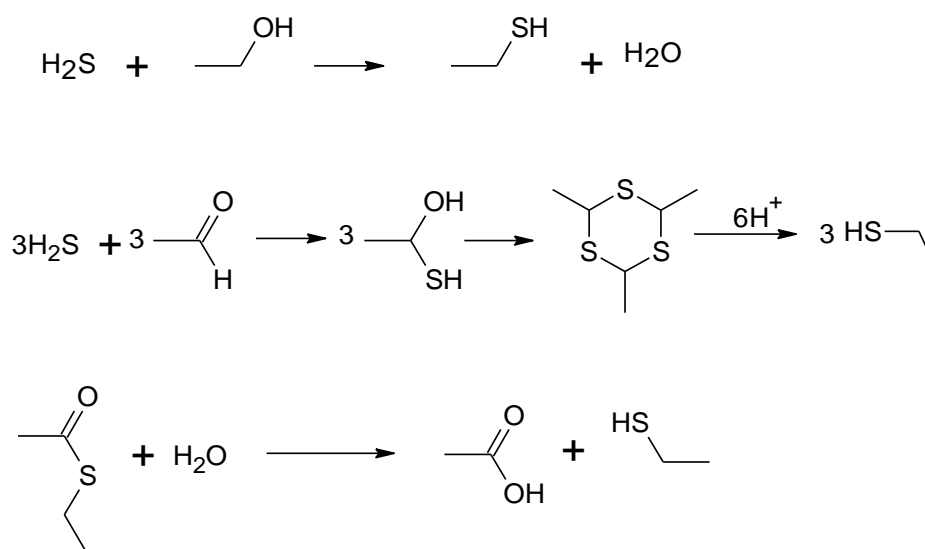


Figura 3- Formação EtSH a partir do etanol, etanal e do éster S-etílico

### 3.4 Eliminação de H<sub>2</sub>S e EtSH

A formação destes compostos no vinho é inevitável. No entanto, com medidas preventivas e correctivas adequadas pode-se minimizar o problema. A adição de uma fonte de azoto ao mosto minimiza a produção de H<sub>2</sub>S e consequentemente de outros compostos de enxofre, entre eles o EtSH. Actualmente usa-se fosfato de diamónio (DAP) como fonte de azoto minimizando a produção de compostos de enxofre, apesar destes compostos estarem sempre presentes, pois são próprios do metabolismo das leveduras [16, 26].

O H<sub>2</sub>S é facilmente removido do mosto recorrendo a arejamento vigoroso ou com recurso a dióxido de enxofre, que promove a transformação de H<sub>2</sub>S em sulfatos [5]. No entanto, o arejamento vigoroso provoca a formação de EtSEt e EtSSEt a partir do EtSH, composto este mais difícil de remover. Por este facto é fundamental perceber que compostos se encontram e em que quantidades no mosto [7].

A nível biológico existem bactérias fotossintéticas que usam compostos inorgânicos como dadores de electrões. As bactérias verdes sulfurosas, em vez de produzirem O<sub>2</sub> a partir da água, formam enxofre oxidando o H<sub>2</sub>S a enxofre elementar que como representado na Figura 4. Posteriormente esse enxofre pode ser oxidado a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> [12].

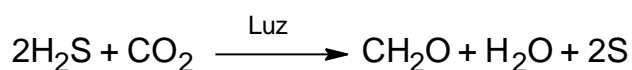


Figura 4- Degradação de H<sub>2</sub>S por bactérias verde sulfurosas

Em nenhuma fase da produção do vinho existem bactérias capazes de realizar essa oxidação, no entanto há métodos simples de verificar quais dos compostos se encontram em maior quantidade. O sulfato de cádmio é utilizado em apreciações olfactivas de vinhos, pois reage com o H<sub>2</sub>S, como representado na Figura 5. Quando adicionado ao vinho, se o mau odor se mantiver indica que a espécie predominante é o EtSH [6, 7].

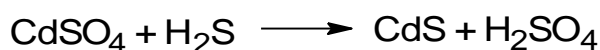


Figura 5- Eliminação de H<sub>2</sub>S com sulfato de cádmio

O sulfato de cádmio é tóxico logo não pode ser usado no tratamento de vinhos. Compostos como o nitrato de prata e sais de mercúrio são potenciais agentes de remoção

de EtSH, mas a legislação não permite a adição destes compostos ao vinho, sendo apenas legal o uso de sulfato de cobre [4, 7, 25].

O cobre existe naturalmente no mosto dos vinhos em elevadas concentrações, entre 10 a 20 mg/l, mas grande parte dele precipita durante a fermentação sob a forma de sulfuretos extremamente insolúveis e a concentração baixa drasticamente para 0,1 a 0,2mg/l [9, 27, 28]. Após a fermentação pode ser adicionado ao vinho, sulfato de cobre para reduzir o teor de compostos de enxofre, diminuindo assim o odor provocado por estes [5, 6]. No entanto, as altas concentrações de cobre no vinho associado a outras condições tais como pH elevado, temperatura, condições de arejamento, presença de taninos entre outros, provoca turvações e precipitações com alteração de aspecto, aroma e gosto [9, 29].

Se após a fermentação, o teor de cobre não se mantiver a níveis inferiores a 1 mg/l, pode acontecer uma turvação ou precipitação mediada por proteínas, designada como casse cúprica. Este fenómeno é acelerado por elevadas temperaturas ou pela presença de luz. Os precipitados são de composição complexa e a sua formação não está totalmente esclarecida [9, 28, 29]. O vinho tinto é pobre em proteínas e não é sujeito a este tipo de casse. No entanto, o cobre pode ainda actuar como catalisador da oxidação do ferro levando à casse férrica, ou seja a precipitados contendo ferro [19, 27, 29].

A reacção química de formação dos precipitados de cobre com enxofre está representada na Figura 6

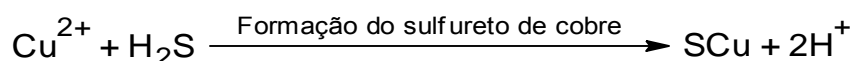


Figura 6- Mecanismo da formação da casse cúprica

Após a formação do sulfureto de cobre (SCu), existe floculação mediada por proteínas, com formação de turvação e depósito [27, 28].

Durante a casse cúprica pode ainda ocorrer a redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a cobre metálico, precipitando-se sob a forma de cobre coloidal ou reduzindo o  $\text{SO}_2$ .

Teores anormalmente grandes de cobre têm efeitos toxicológicos [9, 30]. Para prevenir estes efeitos e os fenómenos de casse, no âmbito da organização internacional da vinha e do vinho (OIV) é permitida a utilização de 1g de cobre por hectolitro de vinho para eliminar espécies químicas que provocam maus odores no vinho. Este regulamento impõe ainda que esta adição de cobre deve ser efectuada no mosto de uvas parcialmente fermentado, e o produto tratado não deverá conter valores superiores a 1mg/L [9].

O teor de cobre no vinho pode ser reduzido por meios legais. No entanto são processos muito demorados e impraticáveis à escala industrial [33]. Existem equipamentos extremamente precisos e baratos, próprios para determinar a concentração de cobre presente no vinho.

A nível laboratorial pode-se determinar a concentração dos compostos de enxofre que causam odores de redução, mas esta análise em laboratório tem imensas limitações e portanto é necessária a criação de uma metodologia rápida e precisa para determinar a concentração destes compostos e prever a quantidade de cobre que deverá ser adicionada ao vinho, para se obterem vinhos de elevada qualidade, sem maus odores e sem problemas de instabilidade por excesso de metais.

A rapidez do método de análise é essencial não só para efeitos correctivos mas também preventivos, pois a análise do mosto permite determinar a espécie preponderante e depois tomar as devidas medidas de correcção.

## 4. SENSORES DE MASSA

---



## 4.1 Sensores Químicos

Os sensores químicos permitem a determinação qualitativa e quantitativa de uma substância específica por meio da interação do analito com uma camada química sensível. Pretende-se que reaja de forma selectiva embora os interferentes sejam normais em quantificações analíticas. O transdutor, unidade básica de um sensor, responde a um sinal analítico e traduz a magnitude do sinal numa medida da quantidade do analito [34]. Estes sensores podem ser classificados segundo o princípio de funcionamento do transdutor, por exemplo:

- Electroquímicos: sensores potenciómetro, voltamétrico;
- Ópticos: medições espectroscópicas associadas a uma reacção química. A absorvência, reflectância e a luminescência são as medições usadas em diferentes sensores ópticos;
- Calorimétrico: Um termistor ou um termómetro de platina mede o calor envolvido numa reacção exotérmica;
- Sensores químicos de massa: o transdutor transforma uma variação de massa numa variação de propriedade eléctrica;

A metodologia proposta visa a utilização de um sensor químico que transforma uma variação de massa numa variação da frequência, que geralmente é associado a utilização de cristais piezoeléctricos. O cristal revestido ou os próprios eléctrodos onde o cristal está ligado, interagem com o analito em estudo, e recorrendo a uma microbalança sensível, neste caso um frequencímetro, permite determinar a quantidade de analito que está presente. Esta técnica está relacionada com o efeito piezoeléctrico.

## 4.2 Piezoelectricidade

A etimologia do termo piezoelectricidade deriva do grego, onde “piezo” significa pressionar sendo que a palavra piezoelectricidade é definida como a capacidade que certos materiais têm de desenvolver entre superfícies deformadas uma diferença de potencial à aplicação de uma pressão externa [35, 36].

Este termo foi sugerido por W. Henkel em 1881 mas o estudo foi desenvolvido pelos irmãos Jacques e Pierre Curie em 1880. O estudo baseou-se no aparecimento de cargas eléctricas em cristais quando sujeitos a pressão mecânica, e foi desenvolvido em vários cristais entre eles o quartzo [36].

Este efeito é encontrado em materiais sem centro de simetria, e se houver alguma perturbação na polaridade da pressão mecânica aplicada, varia também a polaridade do campo eléctrico gerado [35].

Este fenómeno de aplicação de uma pressão mecânica no cristal, gerando uma diferença de potencial eléctrico é designado como efeito piezoeléctrico directo. Existe também o efeito piezoeléctrico inverso, onde se aplica uma diferença de potencial na superfície do cristal, este sofre expansão ou retracção de volume que resulta na formação de uma onda mecânica que se propaga pelo meio [35, 36].

O efeito piezoeléctrico inverso pode também ser utilizado na geração de ultra-sons. Se o cristal for exposto a um campo eléctrico com frequência elevada, o cristal converte essa frequência em variações mecânicas extremamente rápidas e são gerados os ultra-sons [37].

Na prática laboratorial a aplicação de uma diferença de potencial alternada no cristal causa oscilações mecânicas, consoante a geometria e propriedades do cristal, e este oscilará mecanicamente em modo ressonante. Estas condições significam que o cristal piezoeléctrico pode oscilar em modo de cisalhamento ou seja, a onda propaga-se perpendicularmente ao campo eléctrico como demonstrado na Figura 7 [35, 36, 38].

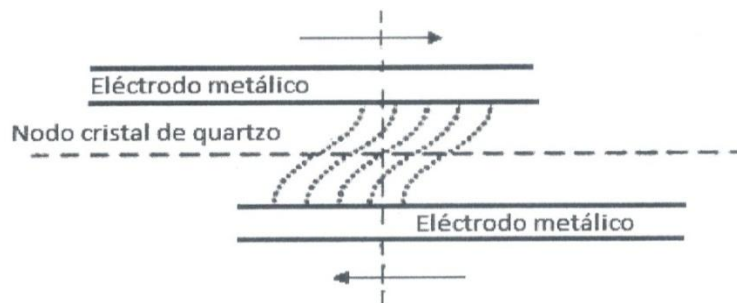


Figura 7- Representação da onda que se propaga através do material, perpendicularmente as faces do cristal de quartzo [39]

As dimensões do cristal influenciam a frequência de ressonância, portanto se for depositada uma fina camada de um material na sua superfície a frequência é alterada. Os eléctrodos de metal, como de ouro, ligados aos terminais são depositados na superfície do disco como na Figura 8. Os cristais mais utilizados são os de quartzo, que serão referidos posteriormente, que vibram numa frequência de cerca de 9MHz. Esta frequência é medida recorrendo a um frequencímetro.



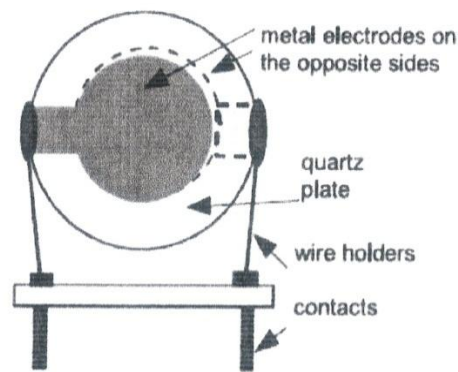


Figura 8- Cristal piezoelétrico de quartzo com eléctrodos [39]

### 4.3 Cristais piezoelétricos de quartzo

Existem 21 classes de cristais sem centro de simetria, e 20 delas são piezoelétricos. Os cristais de quartzo alfa ( $\alpha$ -SiO<sub>2</sub>) são os mais utilizados devido à excelente combinação de características que apresentam, pois são inertes, insolúveis em água, apresentam resistência térmica até aos 579°C, sem perda das propriedades piezoelétricas [40], além de apresentarem um factor de qualidade (Q) extremamente elevado [35, 38]. Este factor relaciona a razão entre a energia armazenada e perdida durante um ciclo de oscilação. No caso dos cristais piezoelétricos este factor pode ser de vários milhares, o que garante a estabilidade da frequência e que permite que este tipo de cristais possam ser usados como geradores de ultra-sons.

Um cristal piezoelétrico pode ser definido por um eixo de coordenadas a 3 dimensões. Os cortes realizados nestes cristais determinam as suas propriedades físicas e eléctricas e também o coeficiente de temperatura [35]. Um cristal com um coeficiente de temperatura negativo, quando sujeito a um aumento de temperatura diminui a frequência de ressonância, o contrário acontece nos cristais com coeficiente de temperatura positivo, se a temperatura aumenta a frequência também aumenta. Ambos estes efeitos influenciam a eficiência do processo negativamente e para minimizar estes efeitos, regra geral, opta-se pelo uso de cristais com cortes AT e BT, como representado na Figura 9, pois estes cortes apresentam coeficientes de temperatura próximo de zero [35, 38, 40].

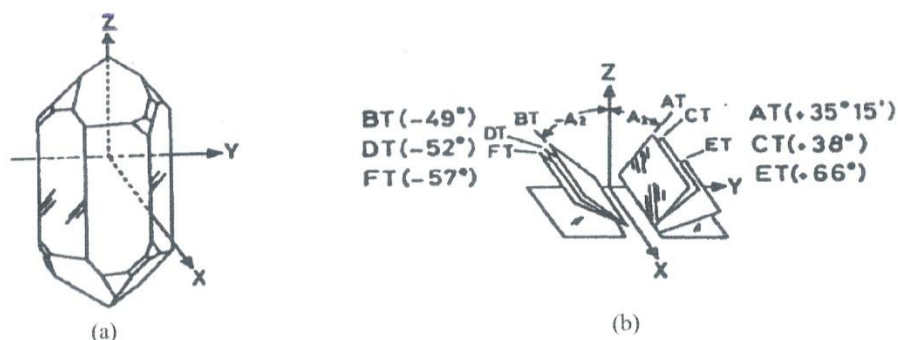


Figura 9- Estrutura cristalina do quartzo com representação dos eixos coordenados e os vários cortes possíveis [39]

#### 4.4 Microbalança de cristais de quartzo (QCM)

O fundamento básico de uma microbalança de cristais de quartzo é simples, uma vez que se baseia na diminuição da frequência de vibração a que o cristal é sujeito quando existe uma variação de massa à sua superfície [35, 38, 40].

Em 1959 Sauberbrey verificou que a variação da frequência é linearmente proporcional a massa depositada. Este facto deve-se à alteração da distância que a onda acústica percorre entre as 2 superfícies do sensor. Se o revestimento aplicado ao cristal for fino e rígido, adquire propriedades acústicas semelhantes às do quartzo podendo-se relacionar a variação da frequência com o aumento da espessura [35, 38].

Existem dois métodos possíveis para detectar e quantificar o analito: sem revestimento, quando o analito interage com o próprio eléctrodo, ou com revestimento quando é necessária uma camada química sensível ao analito. Existem vários tipos de eléctrodos disponíveis, como já foi referido, tendo sido usados eléctrodos de ouro para diversos compostos à base de enxofre [41].

#### 4.5 Critérios para escolha do revestimento e aplicação

A escolha do revestimento é um dos passos que causa maior variabilidade na análise. Um revestimento ideal é aquele que apresenta elevada estabilidade, reversibilidade e sensibilidade e permitindo o fabrico de dispositivos com elevada selectividade e tempo de resposta curto. A interacção entre o analito e o revestimento deve ser fraca e sem formação ou quebra de ligações, para que a reversibilidade do processo se possa dar rapidamente. A especificidade do sensor ao analito é inatingível.

No entanto deve-se garantir que não existe interferência com outros analitos, devendo por isso o sensor ser muito selectivo [42].

Quanto à aplicação, deve ser simples, para que seja facilmente reproduzível, e realizada com solventes voláteis. A sensibilidade do detector depende da quantidade de revestimento distribuído pela área activa do cristal. Existem diferentes métodos de aplicação do revestimento, sendo os mais comuns o uso de micro-seringa, a submersão numa solução e a aplicação com spray [43].

#### **4.6 Vantagens e desvantagens da QCM**

Esta técnica é promissora na análise de analitos, pois trata-se de um equipamento simples, de tamanho reduzido, material barato e os cristais de quartzo são de fácil aquisição. É também um método muito sensível e que pode atingir uma excelente exactidão e precisão.

A elevadíssima sensibilidade pode tornar-se num inconveniente, pois é a causa da variabilidade observada nos resultados. Os cristais variam entre si em tamanho e nas imperfeições à superfície, bem como a variação no tamanho dos eléctrodos [44].

A forma como o cristal é posicionado também é um factor de variações nas análises, pois aqueles que estão em posição perpendicular em relação ao fluxo permitem maior interacção entre o cristal e o analito conduzindo a maior sensibilidade. Os que estão posicionados paralelamente ao fluxo de gás minimizam efeitos de variação de caudal.

Como já foi referido, os coeficientes de temperatura dos cristais com cortes AT não são significativos e minimizam os efeitos da variação da temperatura sobre a oscilação do cristal. Porém em alguns casos o revestimento é muito sensível a essas variações e pode ainda apresentar outras complicações, tais como alterações físico-químicas ou a sua durabilidade.



## 5. MÉTODOS DE DETECÇÃO PARA H<sub>2</sub>S E ETSH

---



## 5.1 Metodologias de quantificação convencionais

A determinação do teor de H<sub>2</sub>S e EtSH no vinho apresenta várias complicações. O vinho é uma matriz complexa onde existem centenas de diferentes compostos, sendo que a grande maioria contribui para que seja um produto mundialmente apreciado, embora existam alguns que afectam as qualidades organolépticas, tais como os compostos de enxofre. Como já foi discutido, alguns destes compostos não influenciam negativamente o aroma do vinho, mas o H<sub>2</sub>S e o EtSH por serem compostos voláteis, com limites de percepção baixos e com odor extremamente desagradável, podem deteriorar a qualidade do produto final, se não forem aplicadas medidas correctivas durante a vinificação [5, 16].

A volatilidade destes compostos traz dificuldades na sua quantificação. Por serem bastante reactivos, reagem rapidamente com metais e podem formar precipitados ou complexos de difícil determinação, sendo também susceptíveis à oxidação [45].

Um problema inerente a estes compostos no vinho é o seu baixo limite de percepção, ou seja, influenciam o aroma do vinho em concentrações muito reduzidas, mas por se tratarem de compostos voláteis tornam-se apropriados para o uso em cromatografia gasosa [10]. A utilização da cromatografia gasosa acoplada ao detector fotométrico de chama pulsada (GC-PFPD), após extracção e derivatização dos compostos de enxofre, demonstra ser uma técnica eficaz, e barata relativamente a outras técnicas baseadas em GC, mas com elevado limite de detecção e baixa repetibilidade e reprodutibilidade [21, 46].

Outra metodologia disponível é a derivatização após a separação em GC e recurso a espectrometria de massa para identificação dos compostos (GC-NCI-MS). A derivatização aumenta a estabilidade e detectabilidade dos compostos, e permite obter resultados satisfatórios com pequenas quantidades de amostra. No entanto trata-se de uma técnica dispendiosa e com diversas dificuldades de aplicação [45]. O uso de técnicas de extracção e preparação das amostras, além de complicar o processo torna-o mais dispendioso e moroso, podendo ainda existir perdas de amostra nas várias etapas [21, 45]. A espectrometria de massa não é uma técnica eficaz na determinação do teor destes compostos sem recorrer a derivatização, pela dificuldade que se encontra na formação de iões com elevada razão m/z [45].

Existem outros três detectores onde foram estudados os composto de enxofre presentes no vinho, GC-SCD (detector por quimioluminescência de enxofre) [47, 48], GC-AED (detector de emissão atómica) [49], e GC-FPD (detector fotométrico de chama) [48-

50], que é semelhante ao (GC-PFPD) mas com chama contínua. Todas estas técnicas implicam a pré-concentração dos compostos, normalmente por micro-extracção em fase sólida (SPME), entre outros problemas já referidos anteriormente [10].

Devido a todos estes inconvenientes é fulcral obter um método barato, rápido, simples e que implique o mínimo de manuseamento da amostra sendo as microbalanças de cristais de quartzo possíveis de se adequarem a este propósito.

## **5.2 Metodologias de quantificação baseadas em microbalanças de cristais de quartzo**

A determinação de EtSH e H<sub>2</sub>S recorrendo a microbalanças de cristais de quartzo já foi várias vezes estudada. Segundo a bibliografia, para o H<sub>2</sub>S já foram testados vários revestimentos do cristal para amostras líquidas e gasosas: acetona [51], mercúrio [52], solução de iodeto de cádmio, de ureia ou de glicerol [53], fluoreto de tetrametilamónio tetrahidratado (TMAF) [54], trietanolamina (TEA) [55], trióxido de tungsténio [56], entre outros. Uma vez que o limite de percepção do H<sub>2</sub>S no vinho é muito baixo é conveniente usar um revestimento que permita obter um baixo limite de detecção. Segundo a bibliografia os revestimentos de TEA e TMAF são os mais adequados para esta análise[55], sendo que os resultados descritos dificilmente permitiram chegar aos limites de detecção pretendidos [39].

Os dissulfetos (R-S-S-R'), alcanotióis (R-S-H) e dialquil sulfetos (R-S-R') interagem de forma rápida e forte com o ouro. O ouro existente nos eléctrodos de cristais piezoeléctricos reagem reversivelmente com tios e permitem, no caso concreto, a quantificação do teor de EtSH [41, 42].

## **5.3 Análise de H<sub>2</sub>S e EtSH no Vinho por QCM: estado da arte**

### **5.3.1 Introdução**

Num trabalho anterior demonstrou-se a eficiência de quantificação isolada de EtSH e de H<sub>2</sub>S em amostras de vinho sintético, utilizando dois diferentes sensores e também usando um único sensor [39]. Nas secções seguintes será discutido os procedimentos básicos, equipamento usado e os problemas encontrados na determinação dos compostos naquele trabalho. Discutem-se ainda os procedimentos de



pré-concentração destes compostos existentes na literatura, terminando-se com um resumo dos problemas que ainda subsistem.

### 5.3.2 Análise de H<sub>2</sub>S em vinho sintético

Pelos motivos já referidos, o revestimento anteriormente usado para esta análise foi o TEA, e foi utilizado o equipamento representado no esquema da Figura 10. Foi utilizado vinho sintético neste teste.

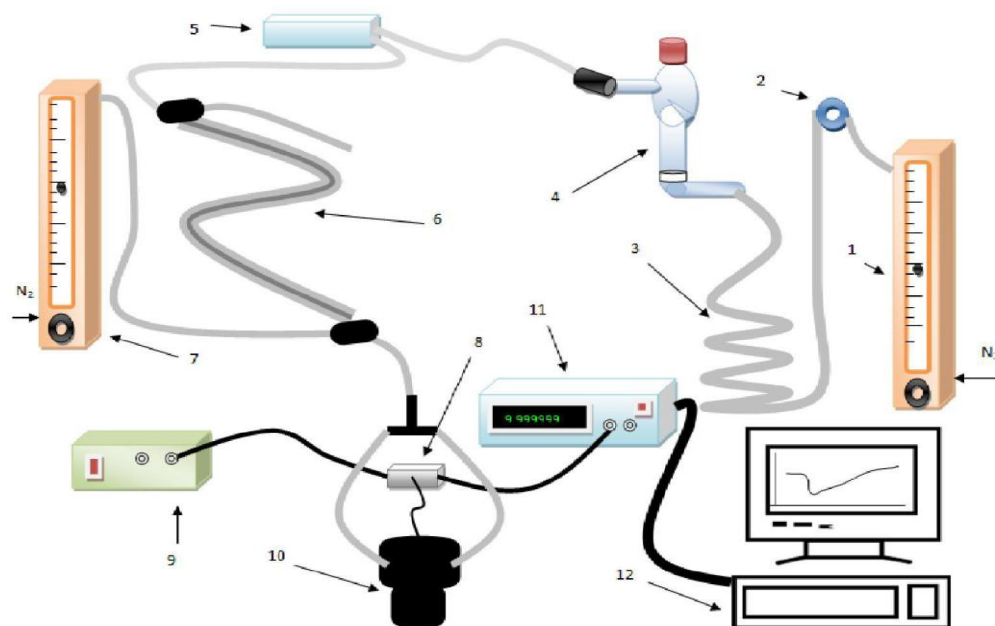


Figura 10- Esquema do sistema usado na determinação de H<sub>2</sub>S: 1/7-Rotâmetro, 2-Porta de injeção, 3-Serpentina, 4-Célula para vinho, 5-Caixa com membrana de nafion e agentes secantes 3<sup>a</sup>, 6-Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 8- Oscilador, 9-Fonte de alimentação, 10- Célula do cristal, 11- Frequencímetro, 12- PC para aquisição de dados [39]

O caudal usado neste sistema foi de 12 mL/min e, como se pode ver na Figura 10 era dividido em duas correntes antes da chegada à célula e dirigido para os eléctrodos do cristal no interior da célula.

Como é possível verificar pela Figura 11 o H<sub>2</sub>S reagiu de forma reversível com a TEA. A resposta foi de aproximadamente 4 minutos após a injeção do H<sub>2</sub>S, e foram necessários cerca de 50 minutos para a recuperação do cristal.

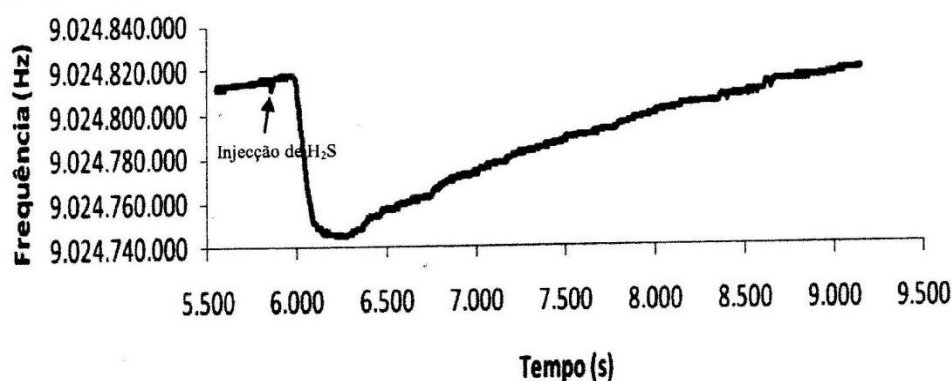


Figura 11- Forma do sinal analítico após injeção de um padrão de  $\text{H}_2\text{S}$  (4)

Foi possível verificar que o  $\text{H}_2\text{S}$  atravessava o vinho e atinge o cristal originando uma resposta por parte do sensor. Foi determinada uma zona de calibração linear compreendida entre 0,0994 e 0,2652  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{S}$ .

### 5.3.3 Análise de EtSH em vinho sintético

Como já foi referido, a detecção e quantificação de EtSH foi realizada com um cristal com eléctrodos de ouro, não revestido. A Figura 12 representa esquematicamente o mecanismo utilizado. Neste procedimento foi também utilizado vinho sintético.

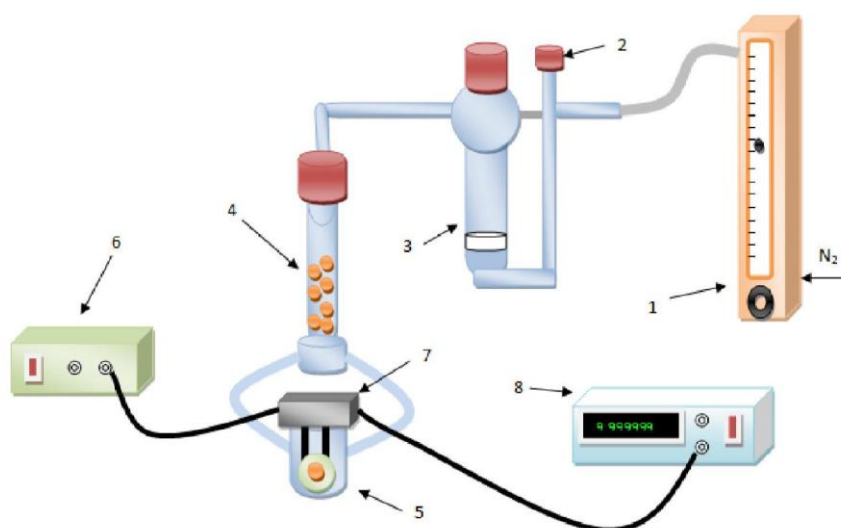


Figura 12- Esquema do sistema usado na determinação do EtSH no vinho sintético: 1-Rotâmetro, 2/3 Célula para vinho, 4-Célula com agentes secantes; 5-Célula do cristal, 6-Fonte de alimentação, 7-Oscilador, 8-frequencímetro [39]

A abertura situada em 2 foi utilizada para a injeção dos padrões líquidos de EtSH que por serem extremamente voláteis passavam rapidamente ao estado gasoso e foram conduzidos pelo fluxo do gás de arraste. Antes da entrada na célula o caudal do gás foi dividido em 2 correntes em direcção ao centro dos eléctrodos. O caudal foi de 31 mL/min.

Foi possível verificar através da análise da Figura 13, que a resposta era rápida, cerca de 25 segundos e a recuperação do cristal ocorre em aproximadamente 3 minutos.

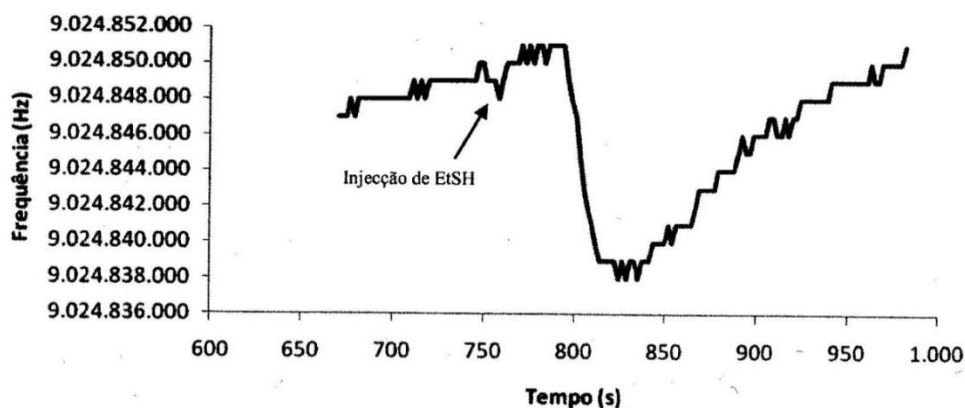


Figura 13- Forma do sinal analítico após injeção de um padrão líquido de EtSH [39]

A calibração linear estava compreendida entre 54,08 e 135,2  $\mu\text{mol}$ . Estes valores elevados são justificáveis pelo facto de se ter usado uma célula maior, que provoca a degradação do sinal.

### 5.3.4 Sensor único para H<sub>2</sub>S e EtSH em vinho sintético

Nesta parte do procedimento, pretendeu-se verificar se o sensor para o H<sub>2</sub>S responde ao EtSH e vice-versa. Constatou-se que na montagem do H<sub>2</sub>S (Figura 10) se obteve uma resposta para o EtSH, mas na montagem para de quantificação do EtSH não existia resposta ao H<sub>2</sub>S. Devidas as irregularidades inerentes ao processo de revestimento, certas áreas do eléctrodo permanecem descobertas de TEA e existe interacção entre o EtSH e o ouro nessas áreas.

Para a separação e a determinação dos compostos é necessário que eles interajam em momentos diferentes e deve-se dar a recuperação do cristal antes do início da quantificação do segundo composto. Portanto, recorreu-se a adição de uma solução de NaOH ao vinho para prender o H<sub>2</sub>S enquanto se quantifica o EtSH. Após esse passo, acidificou-se a solução e observou-se a resposta do sensor ao H<sub>2</sub>S. Na Figura 14 foi possível verificar a separação dos dois compostos recorrendo a esta técnica.

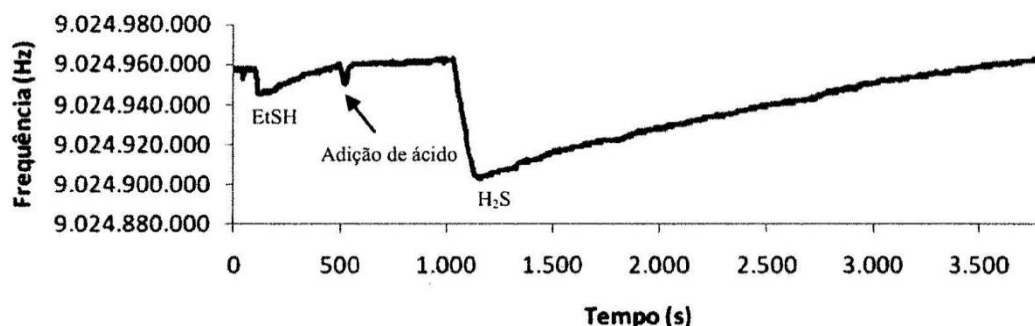


Figura 14- Forma dos sinais analíticos após alcalinização e acidificação da amostra [39]

A zona de calibração para o H<sub>2</sub>S é a mesma já referida em 5.3.2, como seria de esperar, quanto ao EtSH, mesmo com a área de contacto com os eléctrodos de ouro reduzida, apresenta uma gama de valores de calibração relativamente mais baixos. Isto deve-se provavelmente ao uso de uma célula de menores dimensões. Esta gama de concentrações é muito superior as concentrações destes compostos no vinho. Assim, através deste método e para amostras reais, foi sugerida a utilização de mecanismos de pré-concentração.

### 5.3.5 Sensor único para H<sub>2</sub>S e EtSH em amostras reais

Neste procedimento utilizaram um mecanismo idêntico ao esquema da Figura 10 e depararam-se com vários interferentes, como o CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, que foi necessário remover. Para remover a água utilizaram-se 2 membranas de Nafion, uma na caixa com MS-3A (5) e uma segunda membrana com contra corrente de azoto (6). Para remoção do SO<sub>2</sub> faz-se atravessar o gás por uma coluna de MS 3A Rb<sup>+</sup>. Após várias tentativas neste procedimento, não se encontrou nenhuma forma de remover o CO<sub>2</sub> sem haver também a eliminação do H<sub>2</sub>S. No entanto é sugerido um procedimento que permitiria a pré-concentração dos compostos, e ainda a separação do interferente CO<sub>2</sub>.

## 5.4 Pré-concentração e análise de H<sub>2</sub>S por QCM: Estado da arte

### 5.4.1 Introdução

Um outro trabalho desenvolvido no laboratório pelo Doutor Daniel Fernandes, provou ser possível pré-concentrar o H<sub>2</sub>S e simultaneamente eliminar o CO<sub>2</sub> [55, 57].

De modo a avaliar halitoses orais, através da quantificação de H<sub>2</sub>S, foi desenvolvido um procedimento onde este composto é retido numa coluna de carvão activado refrigerada por um sistema de Peltier. Este sistema permite a injeção de várias alíquotas da mesma amostra, ou uma enorme quantidade de uma amostra sem que haja degradação do sinal provocadas pelo elevado tempo de injeção e minimizando os efeitos de difusão.

Foram também testados neste trabalho os diversos revestimentos para a detecção de H<sub>2</sub>S bem como compostos adsorventes para a coluna de pré concentração, sendo escolhidos a TEA e o carvão activado, respectivamente.

### 5.4.2 Sistema Experimental

A Figura 15 representa esquematicamente o sistema experimental utilizado nesse trabalho para análise de H<sub>2</sub>S no ar expirado.

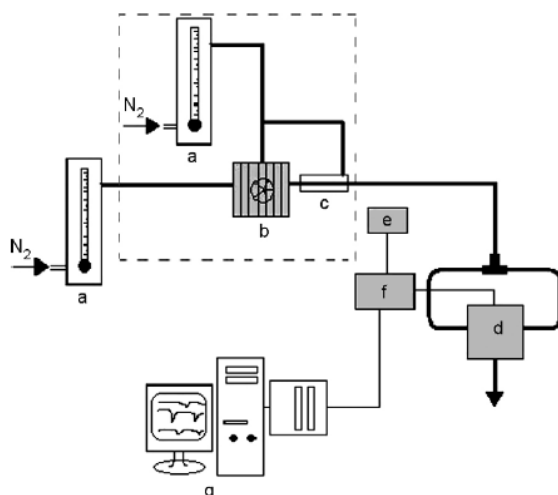


Figura 15- Sistema experimental com células de PVC e com unidade de pré-concentração para a análise de H<sub>2</sub>S no ar expirado: a) rotâmetro, b) Unidade de pré-concentração, c) membrana de nafion, d) Célula de PVC, e) fonte de alimentação, f) oscilador com circuito divisor, g) computador com sistema de aquisição PXI-6608 [55]

O sistema experimental parte de uma entrada de azoto regulada por um rotâmetro, cujo fluxo de azoto percorre o sistema, onde passa primeiramente por uma porta de injeção de gases e é encaminhado para a unidade de pré-concentração de H<sub>2</sub>S, que consiste numa coluna refrigerada onde é adsorvido o analito. Após o aquecimento a cerca de 250°C, o H<sub>2</sub>S é libertado do carvão activado e é encaminhado ao sensor. A Figura

16 representa esquematicamente a porta de injeção, a unidade de pré-concentração e os fluxos de azoto.

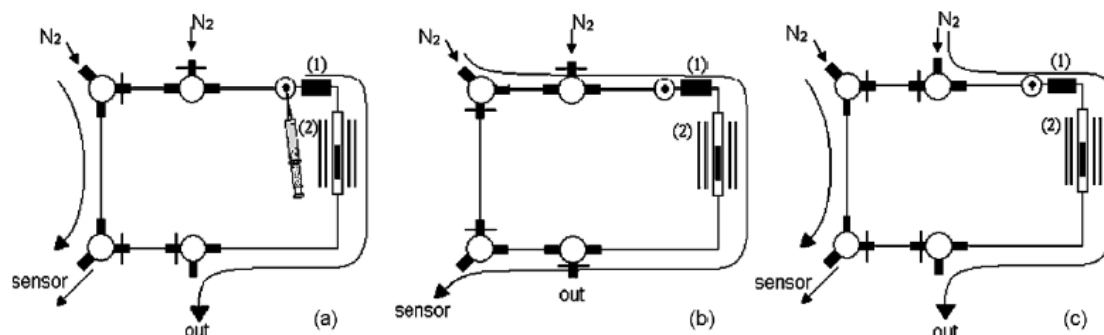


Figura 16- Sistema de injeção e unidade de pré-concentração com indicação da direcção dos gases nos vários passos da análise: a) pré-concentração, b) dessorção e análise, c) eliminação da água e regeneração da coluna [55]

A segunda entrada de azoto tem a função de regenerar a coluna e na corrente de azoto da parte exterior da membrana de Nafion.

A unidade de pré-concentração e o sistema de aquisição de dados foi desenvolvido e otimizado em laboratório pelo autor da dissertação. O sistema utilizado nesta determinação é capaz de ler vários sensores em simultâneo, pois foi desenvolvido também para ser usado como nariz electrónico.

Para aumentar a sensibilidade da técnica de forma a atingir baixos níveis de detecção e quantificação foi utilizada uma placa de aquisição PXI-6608 e foram otimizados osciladores e a fonte de alimentação bem como o desenvolvimento de um programa construído em LabView que controla o modo de contagem da frequência e que adquire os dados provenientes da placa PXI-6608. Esta optimização do processo permitiu ler variações de 0,1 Hz em intervalos de tempo de 1 segundo. Deste modo aumenta-se a sensibilidade do método, sem perder resolução por perda da dinâmica de adsorção do analito ao sensor que existe na maioria dos sistemas tradicionais que apenas permitem ler variações de 0,1 Hz em intervalos de 10 segundos.

### 5.4.3 Análise de H<sub>2</sub>S de amostras de hálito

A utilização de carvão activado na coluna de pré-concentração demonstra ser o composto mais adequado pois, adsorve o H<sub>2</sub>S quando refrigerado, e permite eliminar o

CO<sub>2</sub> durante o processo de injeção, e não demonstrou ser tão selectivo para a água como outros compostos testados. Esta metodologia não é influenciada significativamente por outros potenciais interferentes permitindo uma análise satisfatória da quantidade de H<sub>2</sub>S.

Este método provou ser eficaz para o diagnóstico de halitoses orais, e obteve-se um limite de detecção de 28 ng para o H<sub>2</sub>S. É um método sensível, reprodutível e adequado ao objectivo do trabalho.

## **5.5 Virtudes e problemas das metodologias existentes e a sua aplicabilidade ao presente trabalho**

Através dos trabalhos anteriores [39, 57] verifica-se a adequabilidade das microbalanças de cristais de quartzo para a detecção e quantificação de VSC. Em amostras de vinho estes compostos encontram-se em quantidades muito reduzidas, sendo necessário a optimização de uma metodologia, utilizando a técnica de QCM, de modo a aumentar a sensibilidade, para que seja possível a detecção destes compostos.

O revestimento escolhido para a detecção de H<sub>2</sub>S foi a TEA pois foi o composto com que D. Fernandes et al. [55] conseguiram um limite de detecção mais baixo, é pouco higroscópico e é menos sensível a variações da temperatura em relação a outros revestimentos também testados para a detecção de H<sub>2</sub>S.

Também já se sabia de trabalhos anteriores [41] que o EtSH interagiu reversivelmente com os eléctrodos de ouro do cristal, e que apresentava respostas rápidas e reversíveis em cristais de ouro revestidos com TEA.

Quanto ao método de pré-concentração os trabalhos anteriores apontam para a possibilidade de usar carvão o H<sub>2</sub>S e os peneiros moleculares 5A para o tiol.

Nenhum dos trabalhos anteriores testou a pré-concentração destes dois gases em amostras de vinho e não é possível saber-se de antemão se estes dois métodos de pré-concentração são adequados para as amostras em causa.

Abrem-se ainda outras possibilidades nunca abordadas nos trabalhos referidos, nomeadamente a possibilidade de converter o H<sub>2</sub>S em tiol e o problema se resumir agora a detecção de único composto, para o qual se podem detectar em cristais não revestidos, que a partida seria menos sensível ao problema da presença de grandes quantidades de água e limita os possíveis interferentes.





## 6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E INSTRUMENTAÇÃO

---



O trabalho experimental realizado partiu de uma serie de pressupostos descritos na bibliografia. As montagens sofreram diversas alterações ao longo de toda a optimização do processo, e serão descritos neste capítulo os reagentes, procedimentos, montagens e equipamentos idênticos nas várias etapas do processo de optimização e de aquisição de dados.

## 6.1 Reagentes

Como gás de arraste foi utilizado azoto N<sub>2</sub> N50 Alphagaz da ArLíquido, para o revestimento dos cristais foi utilizado N<sub>2</sub> N45 Alphagaz da ArLíquido e para o arrefecimento da coluna de pré-concentração pelo dispositivo de Peltier foi utilizado Ar sintético Alphagaz da ArLíquido

Todos os peneiros moleculares usados no trabalho prático foram activados em uma mufla a 300°C.

Ácido clorídrico (HCl) 37% Riedel-de-Haën 30721, Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 85% Merck 100573, Ácido sulfúrico 95-97% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Merck 100731, Ácido tartárico (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) Vaz Pereira, Amido Panreac, Carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) Fluka 21060, Carvão activado granulado Merck 3925719, Carvão activado em pó J.T. Baker 7140, Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) Labsolve 50075, Etanol absolut (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) Riedel-de-Haën 32221, Etanotiol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>S) Fluka 04290 Hidróxido de sódio (NaOH) Panreac 131687, Iodato de potássio (KIO<sub>3</sub>) Sigma-Aldrich 30314, Iodeto de potássio (KI) Panreac 121542, Iodo ressublimado (I<sub>2</sub>) M&B MU6609, Metanol (CH<sub>4</sub>O) Sigma-Aldrich 32213, Peneiros moleculares 3A (MS-3A) Riedel-de-Haën D-3016, 4A (MS-4A) Merk 734, 5A (MS-5A) Davidson 754185 e 13X (MS-13X) Fluka 69854, Sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Aldrich 12110088, Sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) Panreac 131717, Sulfureto de sódio (Na<sub>2</sub>S) Vaz Pereira 967, Tiossulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Fluka 72049, Trietanolamina (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>) Merck 8377.

## 6.2 Escolha e aplicação do revestimento

Para a revestir o cristal, o método de aplicação por spray demonstrou ser aquele onde se obtém maior uniformidade na deposição deste tipo de revestimentos [44]. Sendo a TEA um líquido viscoso é necessário diluir portanto, prepara-se uma solução com acetona na razão de 1/10 e a sua aplicação é feita segundo o esquema representado na Figura 17.

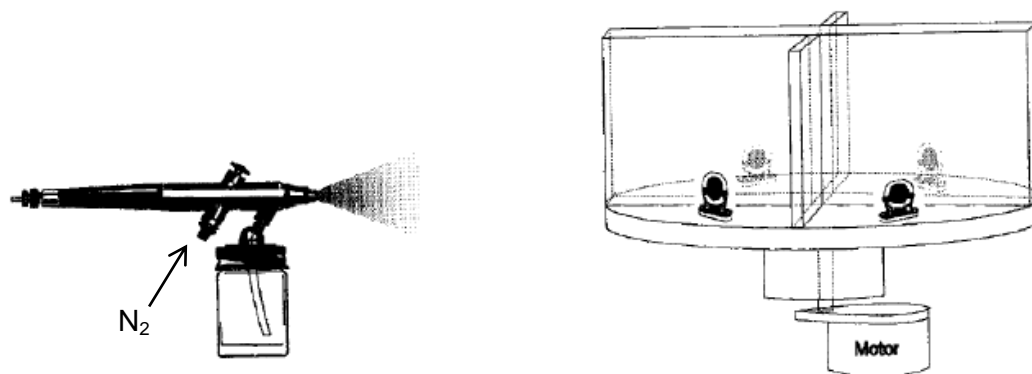


Figura 17- Método de aplicação do revestimento por spray (adaptado de [44])

Esta metodologia engloba um nebulizador com um recipiente onde está a solução de TEA e tem uma entrada de azoto que arrasta a solução. Os cristais são inseridos num prato que passa em frente ao nebulizador e está ligado a um motor que gira a velocidade de 10 rpm.

A quantidade de revestimento depende do caudal de azoto utilizado, do número de vezes que o cristal passa em frente ao nebulizador e a razão TEA/solvente. Este método permite também a aplicação de revestimento em 4 cristais em simultaneamente.

### 6.3 Produção de gases

Na Figura 18 é representada esquematicamente a montagem utilizada para a produção dos vários gases utilizados durante o trabalho experimental. Foi produzido  $H_2S$  para as padronizações e também  $CO_2$  e  $SO_2$  para estudar a interferência destes dois compostos.

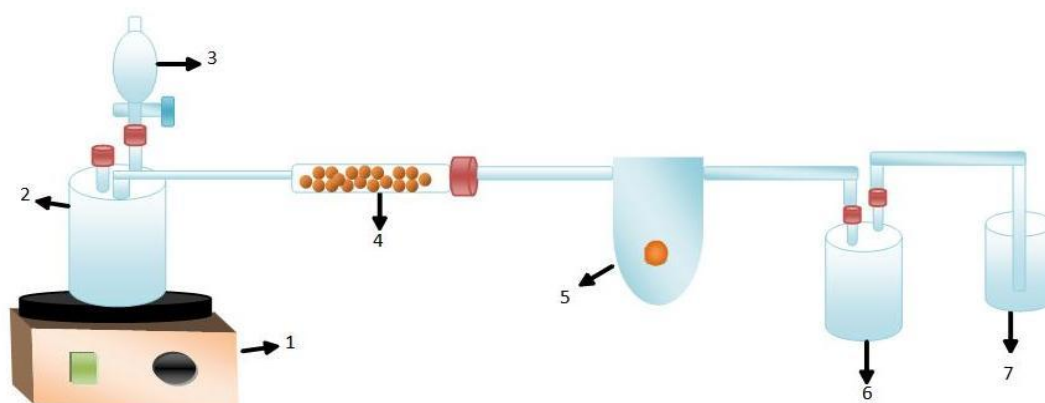


Figura 18- Montagem geral para produção de gases: 1-Placa de agitação, 2-Célula de reação, 3-Funil de carga, 4-Célula de secagem, 5-Pêra de amostragem, 6-Célula de retenção, 7-Borbulhador

Os gases foram produzidos através da adição de um ácido a um sal. O ácido é introduzido no funil de carga e entra gota a gota na célula de reação onde se encontrava o sal sob constante agitação. O gás foi forçado a atravessar uma coluna de sílica-gel para remover a água e chega a pêra de amostragem que tem um septo por onde se retirou o gás por meio de uma seringa. O borbulhador continha uma solução saturada de NaOH para reter os compostos tóxicos produzidos. Por diversas vezes o líquido do borbulhador entrou no sistema por refluxo, e para minimizar os efeitos deste fenómeno foi adicionada a montagem uma célula de retenção que armazena este líquido impedindo a entrada deste no sistema.

Para a produção de  $\text{CO}_2$  não foi utilizada célula de retenção e borbulhador pois os compostos produzidos não apresentam toxicidade considerável.

O  $\text{H}_2\text{S}$  foi gerado pela adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (aproximadamente 50%) ao  $\text{Na}_2\text{S}$ , o  $\text{SO}_2$  é produzido acrescentando  $\text{HCl}$  (37%) a  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  e o  $\text{CO}_2$  pela adição de  $\text{HCl}$  (37%) a  $\text{CaCO}_3$ . Na Figura 19 mostram-se equações químicas globais destas reacções.

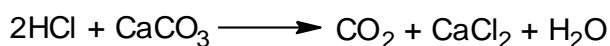
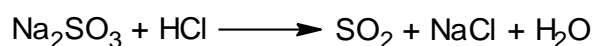
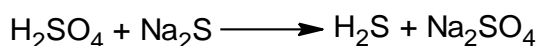


Figura 19- Reacções químicas de formação de gases

### 6.3.1 Padronização de $H_2S$

O  $H_2S$  foi preparado em laboratório como foi descrito na secção 6.3. A padronização do  $H_2S$  foi efectuada para obter a sua concentração exacta e assim preparar padrões de concentração conhecida de modo a obter rectas de calibração.

A padronização de  $H_2S$  foi efectuada através de uma titulação iodométrica indirecta, onde o iodo está presente em excesso na solução, esse excesso será posteriormente titulado com o tiosulfato de sódio. Foi escolhido o iodo, uma vez que o  $H_2S$  é um agente redutor que vai reagir rapidamente e completamente com o iodo, a equação química que traduz esta reacção encontra-se na Figura 21a.

Para a preparação do saco de diluição para o  $H_2S$  foram retirados 30 mL de gás da pêra de amostragem com uma seringa e inseridos no saco de diluição de teflon. Perfez-se o volume do saco com  $N_2$  (N50) até 300 mL. O saco de diluição utilizado comporta até 500 mL de gás. O volume de azoto injectado no saco foi controlado por um rotâmetro. A Figura 20 representa esquematicamente este processo.

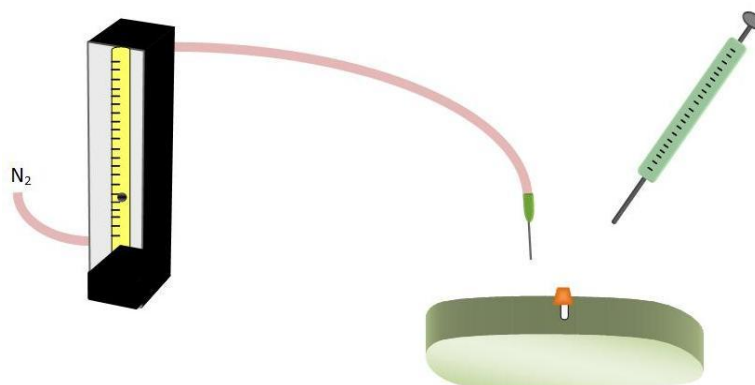


Figura 20- Método de preparação do saco de diluição para  $H_2S$

Após a preparação do saco de diluição, foi então necessário proceder à padronização do  $H_2S$  presente no saco de diluição. Para isso retiraram-se 30mL de gás do saco e injectaram-se num frasco que continha entre 20 a 30mL de NaOH 0,05M. Após a retenção do  $H_2S$  na solução alcalina, transferiu-se esta solução para um *erlenmeyer* que continha 10 mL de solução de iodo 0,05M. Com o aumento do pH perdeu-se a tonalidade castanho-forte da solução de iodo, uma vez que houve a transformação do iodo em hipiodito. Para restabelecer a cor e dar início à titulação com tiosulfato adicionou-se de 2 mL de  $H_2SO_4$  1,0M. Foi utilizado como indicador uma solução de amido (0,1%) que é

adicionada quando a solução atinge um amarelo-pálido. A titulação termina quando a cor azul desaparecer, que significa que o iodo que se encontrava em excesso reagiu todo com o tiossulfato [58]. A equação química desta reacção encontra-se na Figura 21b. A titulação foi efectuada com uma micro-bureta.

O tiossulfato não é um padrão primário, tendo sido padronizado antes da sua utilização. Trata-se de um sal higroscópico, do qual não se conhece o teor real de hidratação. A sua padronização foi efectuada através de uma solução de concentração conhecida de iodato de potássio e iodeto de potássio, encontrando-se este último em excesso (Figura 21c). A água desta solução teve de ser fervida de modo a retirar o  $\text{CO}_2$  para evitar a decomposição do tiossulfato. O iodo formado irá reagir com o tiossulfato, a titulação decorre até se atingir o ponto de equivalência em que o numero de moles de tiossulfato será o dobro do numero de moles de iodo segundo a equação química da Figura 21b. Obtendo-se assim a concentração exacta de tiossulfato 0,1864M.

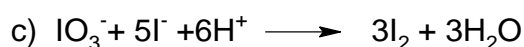
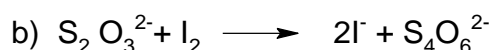


Figura 21- Equações químicas das reacções ocorridas na titulação para a padronização do  $\text{H}_2\text{S}$  (a e b) e para a padronização do tiossulfato (b e c).

## 6.4 Preparação de padrões de EtSH

O EtSH é um líquido, muito volátil e com intenso odor a gás. Este composto é adicionado ao gás de uso doméstico para a rápida detecção de fugas. Trata-se de um líquido muito volátil, tóxico em elevadas concentrações e com baixo limite de detecção. Para minimizar a contaminação do ambiente laboratorial com os vapores deste composto. Retiraram-se cerca de 10 mL do composto para um frasco fechado com septo, o que permitia retirar com uma seringa para líquidos a quantidade desejada no momento da sua utilização. Sempre que possível este composto foi manuseado a frio, de modo a diminuir a sua volatilização.

## 6.5 Medição de Caudais

Neste trabalho experimental o gás de arraste utilizado na grande maioria das operações tinha que ser inerte. Embora a nível económico o ar comprimido seja compensatório, não pode ser usado pois, como já foi referido na secção 5.1, os analitos de interesse para neste trabalho são susceptíveis a oxidação por parte do oxigénio. Outro inconveniente era a presença de água e CO<sub>2</sub> nesta corrente de gás, que são interferentes quando se utiliza cristais revestidos com TEA. Por estes motivos, optou-se pela utilização de azoto, que se pretendia que fosse o mais puro possível.

Quanto a medição de caudais, é importante em duas situações específicas:

- No final do sistema, para se conhecer a velocidade do gás no sistema. A selecção do caudal deverá ter em conta o caudal mínimo para o qual existe reversibilidade da ligação entre os analitos e os sensores.
- Caudal à saída do rotâmetro, usado na preparação do saco com o padrão diluído. É importante para saber o tempo necessário para perfazer o volume do saco de diluição.

Para medir o caudal com eficiência e precisão, optou-se por um sistema simples mas eficaz, que parte da utilização de uma bureta graduada com duas entradas na extremidade inferior. Numa das entradas faz-se entrar o gás proveniente do sistema ou directamente do rotâmetro, e na outra usa-se uma tetina cheia de água e sabão. Pressionando a tetina, o sabão sobe e forma-se uma bolha que percorre a bureta. O caudal é medido verificando o volume que a bolha percorre em 60 segundos. A Figura 22 representa esquematicamente a montagem utilizada.

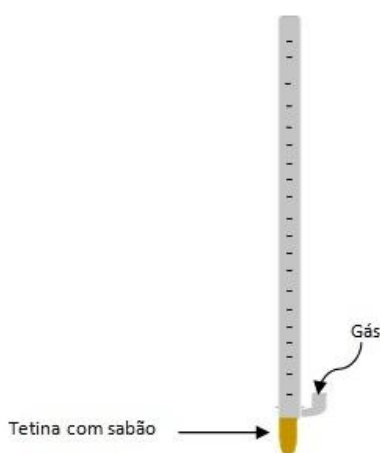


Figura 22- Montagem para medição de caudal



## 6.6 Dispositivos de aquecimento e arrefecimento

As colunas de pré-concentração usadas neste trabalho experimental eram de vidro com cerca de 20 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno.

Para que exista pré-concentração de analitos, o composto que está na coluna tem de reagir reversivelmente com o analito. Comumente são usadas colunas com peneiros moleculares, para absorver os compostos à temperatura ambiente, que depois são libertados durante o aquecimento. Neste trabalho, para reter o  $\text{H}_2\text{S}$  foi usado carvão activado, e para reter o EtSH foram utilizados peneiros moleculares do tipo 5A. No que diz respeito aos tióis são retidos eficazmente nos MS-5A à temperatura ambiente, no entanto o  $\text{H}_2\text{S}$  vai-se libertando lentamente do carvão activado a esta temperatura, mas fica adsorvido no carvão se este estiver refrigerado a uma temperatura inferior a  $5^\circ\text{C}$  [55, 59].

A coluna de carvão activado foi refrigerada por um sistema de Peltier. O aparelho já existia no laboratório.

A junção de dois materiais metálicos a temperaturas diferentes, gera uma diferença de potencial que pode ser quantificada, e o contrário também acontece. Se dois metais condutores ou semicondutores diferentes, são unidos e sujeitos a uma diferença de potencial, produz-se uma diferença de temperatura entre as duas superfícies. A esta junção de dois metais diferentes dá-se o nome de termopar e este fenómeno é designado como efeito termoelétrico. Se forem soldados em série e alternadamente vários fragmentos destes dois metais, unidos nas extremidades a uma placa cerâmica obtém-se um módulo, como representado na Figura 23.



Figura 23- Representação de um módulo e do efeito termoelétrico [60]

As placas de cerâmica promovem um adequado isolamento eléctrico, boa condução de calor e são resistentes à pressão mecânica [61].

Este tipo de sistema pode originar diferenças de temperatura de 65°C entre a parte quente e fria do módulo. Visto este ser um sistema fundamentalmente usado para refrigeração, é aconselhado o uso de um dissipador de calor que melhora a performance de refrigeração. O aparelho utilizado continha 5 módulos em que a parte quente se encontrava unida a um dissipador de calor metálico como representado na Figura 24 [61].

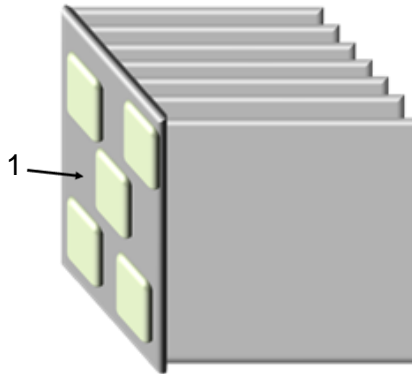


Figura 24- Módulos e dissipador de calor

O sistema utilizado continha duas unidades idênticas à representada na Figura 24. Nas partes em que o dissipador está virado para a parte fria, representado pelo número 1, a temperatura é elevada o que impede a eficiente refrigeração no centro da união entre as duas unidades. Para minimizar este problema foram recortados diversos fragmentos de folha de cortiça, que é um bom isolador térmico, permitindo o correcto arrefecimento da parte interior pelos módulos. Existem também na parte exterior do dissipador duas ventoinhas de cada lado para facilitar a difusão do calor. A parte fria dos módulos é posta em contacto com uma placa metálica que maximiza a área arrefecida. Entre as 2 placas metálicas, faz-se percorrer um tubo de cobre com diâmetro interno de aproximadamente 1mm onde passa ar comprimido, que irá arrefecer a coluna de pré-concentração. A montagem para o arrefecimento é representada na Figura 25.

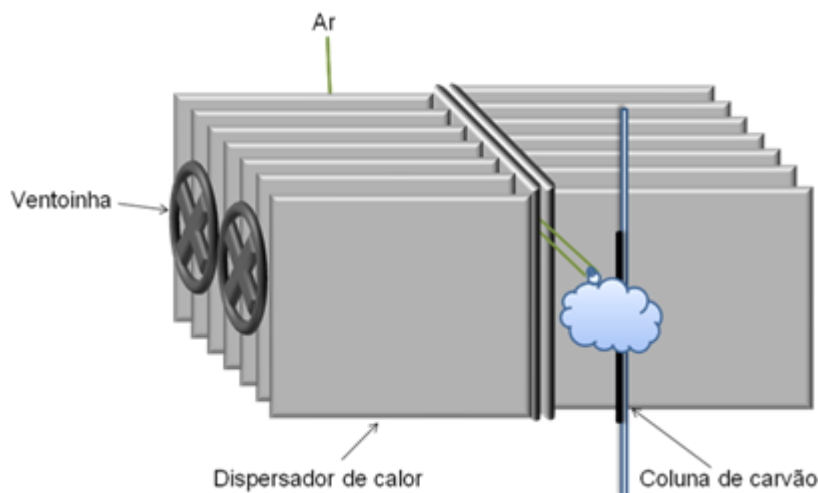


Figura 25- Dispositivo de Peltier e refrigeração da coluna de pré-concentração

A fonte de alimentação que fornece energia ao sistema de Peltier, fornece também corrente à resistência eléctrica que aquece a coluna de pré concentração, controlada por um amperímetro. De modo a não sobrecarregar a fonte, existe um *switch* de 3 posições: Peltier, aquecimento e *off*. Este arranjo permite apenas a ligação de um dos sistemas e está representado na Figura 26.

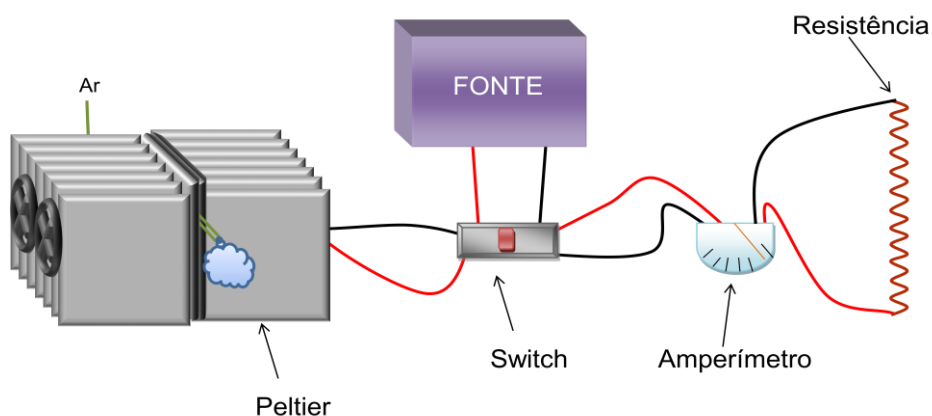


Figura 26- Dispositivo Peltier e de aquecimento

## 6.7 Preparação de amostras de vinho sintético

O vinho sintético é uma solução de água destilada e etanol (12%), com 2,0 g/L de ácido tartárico e 0,02M de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [39].

Para a quantificação do  $\text{H}_2\text{S}$ , o pH do vinho sintético foi ajustado para aproximadamente 9, o que permite reter o analito, libertando-se apenas quando a

solução é acidificada. Esta metodologia evita perdas do composto no manuseamento da amostra, e evita os maus odores.

Para preparar amostras com EtSH foram usados 2 procedimentos diferentes, que serão descritos posteriormente.

## **6.8 Injecção dos padrões de EtSH, H<sub>2</sub>S e amostras de vinho**

Os padrões gasosos utilizados neste trabalho foram injectados no sistema recorrendo a seringas SGE “gas tight”. Foram usadas seringas com volumes compreendidos entre 10 e 500 µL.

Foram injectados padrões líquidos de EtSH de duas formas: composto puro através de seringas Hamilton para líquidos, ou diluído através de uma bureta automática (Crison).

Não foi possível injectar padrões puros com volume inferior a 1 µL pois o composto fica retido numa pequena bolha a saída da agulha da seringa. Portanto, para injectar padrões de menores volumes é necessário diluir o padrão num solvente, neste caso o etanol. Outro problema que subsiste é a volatilização do composto, e por este facto é necessário mantê-lo num recipiente de onde não se possa escapar, e onde não existem bolhas de gás, pois o EtSH liberta-se rapidamente e permanece na fase de vapor.

A bureta automática permite injeções de volumes mínimos de 1 µL, portanto foi necessário diluir o EtSH numa solução de etanol na razão 1/11, sendo que o composto neste caso não se perde, pois trata-se de um sistema fechado e totalmente preenchido com a solução. A injeção deste composto é feita na célula de vinho, junto a extremidade inferior onde está a placa de vidro sinterizado. O mecanismo de injeção está representado na Figura 27.

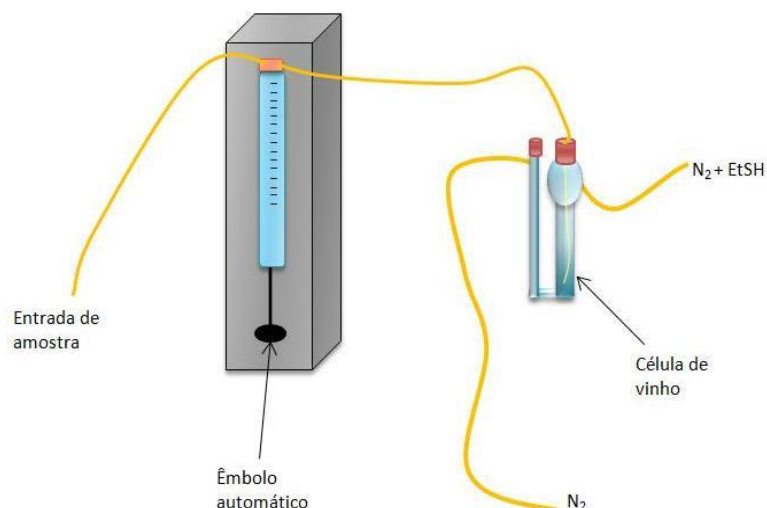


Figura 27- Mecanismo de injeção de padrões de EtSH com bureta automática

O composto está retido na seringa da bureta automática e não escapa para o exterior pois trata-se de um sistema fechado, nem volatiliza para a fase de vapor, pois toda a seringa permanece preenchida com a solução durante todo o procedimento.

As amostras de vinho sintético foram injectadas de duas formas, através de seringa ou através do uso de pipetas. Este último demonstra ser mais rápido, com menor perda dos compostos e também minimiza os fenómenos de difusão.



## 7. NOVAS METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE H<sub>2</sub>S E ETSH

---





## **7.1 Análise de H<sub>2</sub>S e EtSH em amostra de vinho sintético com um único sensor para tióis (cristal não revestido)**

### **7.1.1 Introdução**

Com o intuito de desenvolver um novo método, eficaz simples e barato para a quantificação de compostos voláteis de enxofre no vinho, diversa bibliografia refere a possibilidade de converter de H<sub>2</sub>S em tióis [22, 23, 41].

Os tióis reagem directamente com o ouro, que constituem os eléctrodos do sensor [22, 23]. Tal como já foi provado, o EtSH é quantificado por este sistema, e previsivelmente o mesmo acontecerá com um outro tiol formado pela reacção do H<sub>2</sub>S com outro reagente [41].

Através de pesquisa bibliográfica, realizada para este trabalho, verificou-se que existem várias formas de produzir tióis [22]. Existem alguns requisitos para que a esta metodologia seja praticável no trabalho a ser realizado, principalmente no que diz respeito à toxicidade dos reagentes e dos produtos formados. Existem outros parâmetros fundamentais para a análise de tióis em QCM, tais como:

- Rapidez de reacção pois todo o composto deve interagir com o sensor no menor tempo possível;
- Deve ocorrer preferencialmente em meio básico, permitindo que se quantifique o H<sub>2</sub>S e os EtSH separadamente
- O composto formado deve ser volátil
- Evitar a formação de compostos secundários. O sensor responde a pequenas variações de massa, logo se existirem 2 compostos a contribuir para o sinal do sensor, os resultados não serão credíveis.

De entre as várias reacções possíveis, apenas a reacção de substituição com álcool foi testada, apresentando o único inconveniente de a reacção acontecer em meio ácido. Todos os outros compostos que poderiam ser utilizados implicavam medidas especiais de segurança ou eram de difícil aplicação ao caso em estudo.

É descrito na bibliografia que a reacção de substituição origina elevada percentagem de produtos secundários, mas que com o uso de metanol ou ciclohexanol este problema é minimizado, pois a percentagem de conversão do tiol pretendido é

muito elevada (>95%) [22]. As reacções de substituição com metanol e ciclohexanol estão representadas na Figura 28

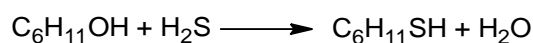


Figura 28- Reacções de substituição com metanol e ciclohexanol

Esta metodologia com uso de metanol é atractiva pois o metanol é barato e formar-se-ia metanotiol que é muito volátil. Já o ciclohexanotiol é pouco volátil e não se adequa à técnica utilizada. Esta metodologia tem diversas vantagens, sendo as mais relevantes a eliminação directa dos interferentes anteriormente descritos como problemáticos em metodologias de QCM com cristais revestidos. Um cristal não revestido e com eléctrodos de ouro não responde ao CO<sub>2</sub> e ao SO<sub>2</sub> e é menos sensível a presença de água.

Outra vantagem desta metodologia seria o aumento de massa molar do composto a ser detectado. Como as microbalaças de cristais de quartzo são transdutores que transformam uma variação de massa num sinal eléctrico, a maior massa molar de um composto envolve teoricamente maiores respostas por parte do sensor, tornando-se plausível esperar um incremento nos limites de detecção. A detecção de um tiol em vez do H<sub>2</sub>S seria ainda vantajosa em termos de redução nos tempos de análise. O EtSH apresenta resposta em 25 segundos e a recuperação do sensor dá-se em 3 minutos, e poder-se presumir que este outro tiol daria uma resposta semelhante [39].

### 7.1.2 Equipamento

Como foi referido anteriormente, a metodologia proposta tem por objectivo a exclusiva determinação de alcanotióis. O sensor utilizado continha um cristal de 9MHz com eléctrodos de ouro contido numa célula de PVC com o volume de 0,35 cm<sup>3</sup>. Foi utilizado um frequencímetro Leader LF-826 ligado a um oscilador que esta por sua vez ligado aos eléctrodos de uma célula de PVC que contem o cristal e a uma fonte de alimentação de 5V.

O equipamento utilizado está esquematizado na Figura 29.

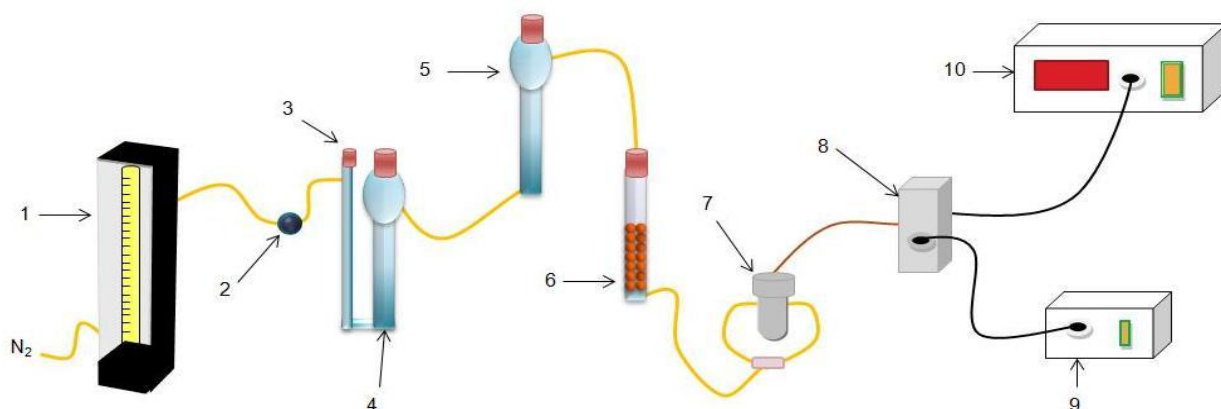


Figura 29- Montagem experimental para síntese e quantificação de tióis: 1-Rotâmetro, 2-Porta de injeção de padrões gasosos, 3-Porta de injeção de padrões líquidos, 4-Célula de vinho, 5-Célula de reacção, 6- Célula com agentes secantes, 7-Célula de PVC do cristal, 8-Oscilador, 9-Fonte de alimentação, 10-Frequencímetro

O sistema representado parte de um rotâmetro que controla o caudal de azoto. Neste procedimento foi utilizado um caudal de azoto de 33 mL/min. Os padrões gasosos de H<sub>2</sub>S e os padrões líquidos de EtSH foram injectados pelas respectivas portas de injeção e o foram forçados a atravessar o vinho, que está contido numa célula, que na extremidade inferior tem uma placa de vidro sinterizado que permite a passagem de gases. Segue-se uma célula de reacção, também com uma placa de vidro sinterizado na parte inferior, onde se pretende que exista a conversão do H<sub>2</sub>S em tiol e posteriormente uma célula contendo agentes secantes. O caudal de azoto é dividido em duas correntes a entrada do sensor e é direccionado aos eléctrodos do cristal.

### 7.1.3 Procedimento experimental

#### 7.1.3.1 Procedimento para recta de calibração de EtSH

Para efectuar uma recta de calibração para o EtSH começou-se por pipetar 10 mL de vinho sintético previamente alcalinizado com NaOH até aproximadamente pH 9, para a célula de vinho. A célula de reacção permanece vazia e foi utilizado orange sílica gel como agente secante. De seguida foram injectados, com seringas Hamilton para líquidos,

padrões de EtSH com volumes compreendidos entre 1 e 22 µL, na porta de injeção de líquidos. O EtSH volatiliza rapidamente e atravessa a placa de vidro sinterizado e o vinho sintético, sendo encaminhado para o sensor. A resposta é medida entre os valores máximos e mínimo de frequência.

### **7.1.3.2 Procedimento para recta de calibração para H<sub>2</sub>S**

Para quantificar o H<sub>2</sub>S em um cristal não revestido é necessário convertê-lo previamente em tiol. Para tal antes da injeção dos padrões de H<sub>2</sub>S, é adicionado a célula de reação 2 mL de CH<sub>3</sub>OH e 0,5 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Os padrões de H<sub>2</sub>S são injectados através da porta de injeção de gases com seringas SGE, e atravessam o vinho e a célula de reação. É medida a resposta por parte do sensor entre os valores da linha de base e o mínimo de frequência detectada.

### **7.1.3.3 Procedimento para análise das amostras**

É descrito na bibliografia, que a pH aproximadamente 9 apenas o EtSH é removido do vinho o que permite a separação dos compostos [39]. Assim começa-se por alcalinizar o vinho e o EtSH é primeiramente removido do sistema e analisado. Para prevenir eventuais reações do tiol com o metanol em meio ácido, a célula de reação permanece vazia durante a quantificação deste composto.

Para a quantificação do H<sub>2</sub>S adicionou-se metanol e ácido à célula de reação, depois acidificou-se o vinho com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para que o H<sub>2</sub>S fosse libertado, este irá reagir com o metanol, esta reação é detectada pelo sensor.

Foram testados 4 interferentes nesta quantificação: H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>OH.

### **7.1.4 Resultados e Discussão**

O EtSH nos padrões foi eficientemente quantificado pelo sensor, sendo a gama linear das respostas obtidas situa-se entre 0,84 e 13 mg, e esta representada na Figura 30

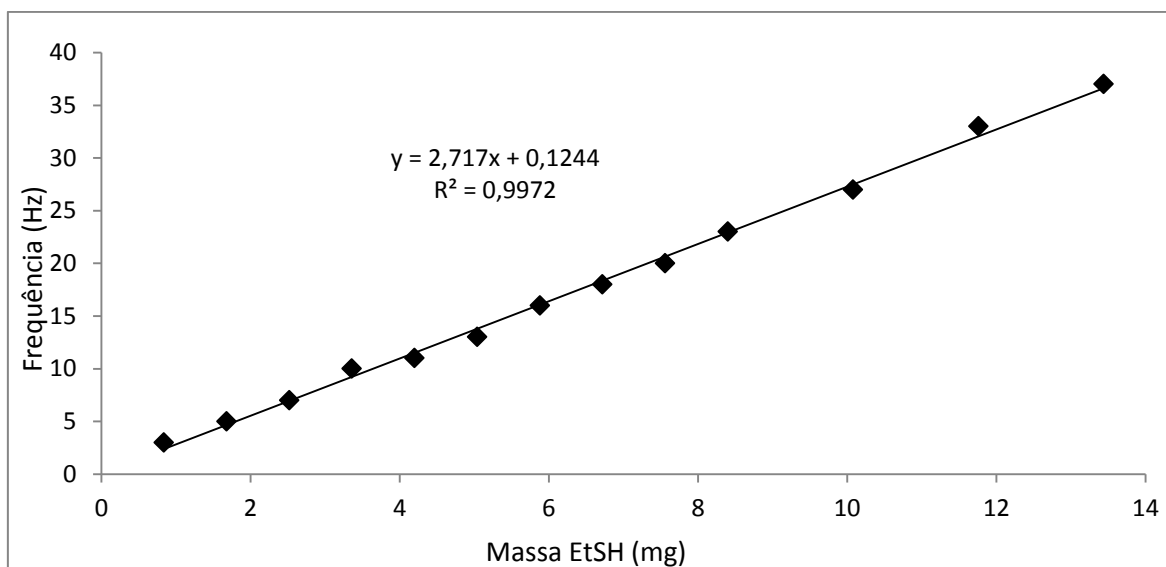


Figura 30- Recta de calibração para EtSH

A sensibilidade do sensor é de 2,7 Hz/mg e apresenta um limite de detecção de 0,54mg e o limite de quantificação é de 1,3mg.

A sensibilidade do sensor não se adequa ao método proposto, pois a concentração de EtSH no vinho com odores de redução é em média de 10,8 µg/L.

A metodologia proposta para a quantificação de H<sub>2</sub>S no vinho não se mostrou funcional. O metanol é volátil, e interfere na quantificação do H<sub>2</sub>S, por reacção com os eléctrodos de ouro ou por condensação. Tal efeito impossibilita a quantificação directa do metanotiol.

Foram testados peneiros moleculares do tipo 3A e 4A na célula de secagem, pois são descritos como peneiros adequados a remoção do metanol, mas não de tióis [59]. Nenhum destes peneiros demonstrou ser eficaz na remoção total do metanol do sistema. Foi também testado a injeção directa de diferentes quantidades de metanol e ácido na célula de vinho, mas a interferência do metanol persistiu. Esta metodologia provou não ser funcional para a quantificação de H<sub>2</sub>S no vinho.

O método de produção de tióis recorrendo a álcoois e a H<sub>2</sub>S é usado à escala industrial, no entanto é descrito como sendo uma reacção que ocorre a 250°C e que usa molibdénio como catalisador [62]. Tal metodologia não pôde ser utilizada no caso em estudo, pois aumentaria em grande escala os interferentes do sistema.

Foi também testada a interferência do CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O neste sistema. O CO<sub>2</sub> e o SO<sub>2</sub>, tal como era espectável, não interagem com o sensor. Quanto a água, é um interferente, mas é removida eficazmente com sílica gel ou com os peneiros testados.

### **7.1.5 Conclusão**

A metodologia proposta não se mostrou funcional para o objectivo do trabalho. Embora o método de quantificação do tiol demonstre ser selectivo e eficiente, não é um método sensível. Para que a metodologia seja funcional é necessário reduzir os limites de detecção e o uso de um sistema que permita pré-concentrar o analito.

A quantificação de H<sub>2</sub>S não mostrou ser adequada para o objectivo do trabalho. O metanol é um líquido muito volátil e é interferente na quantificação, não sendo possível eliminar totalmente o seu contributo para a resposta.

A metodologia proposta poderia ser funcional utilizando outro tipo de reagentes que devido à sua toxicidade, não puderam ser testados no laboratório, pois implicam medidas especiais de segurança. Os compostos mais propensos de serem testados neste sistema seriam os epóxidos [22], sendo o óxido de propileno o mais adequado para a reacção pretendida pois é um líquido, portanto mais fácil de manusear e porque a reacção acontece em meio alcalino. Outra técnica propicia à conversão de H<sub>2</sub>S em tióis é a adição de Michael [22], que pode partir de dois reagentes distintos, mas ambos muito tóxicos: o acrilato de metilo e o acrilonitrilo. Esta reacção é também catalisada em meio alcalino e por aminas à temperatura ambiente. A utilização de haletos de alquila poderia também ser viável na preparação de tióis, mas também estes tipo de reagentes apresenta elevada toxicidade [22].

## **7.2 Análise de H<sub>2</sub>S e EtSH presente no vinho com um único sensor (cristal revestido com TEA)**

### **7.2.1 Introdução**

Devido a impossibilidade de utilizar reagentes mais tóxicos na transformação de H<sub>2</sub>S em tióis, optou-se por um sistema de quantificação directa dos dois compostos de interesse, recorrendo a um único sensor com um cristal revestido com TEA. Tal procedimento parte do pressuposto que os dois compostos são separáveis, e que o

sensor utilizado é sensível aos dois analitos de interesse. Para atingir os limites de quantificação pretendidos, é necessária a utilização de colunas de pré-concentração, sendo escolhidos os peneiros moleculares 5A, e o carvão activado para pré-concentrar o EtSH e o H<sub>2</sub>S, respectivamente.

### 7.2.2 Equipamento

O equipamento utilizado parte de um rotâmetro que controla a o caudal de azoto do sistema. De seguida possui uma porta de injeção para gases, outra para líquidos e a célula de vinho. Devido a utilização de um cristal revestido numa substância com alguma solubilidade em água, é previsível uma maior interferência por parte da água em relação ao procedimento da secção anterior, tendo por isso sido necessário adicionar uma caixa com uma membrana de Nafion em contacto com agentes secantes a saída da célula de vinho e uma membrana de Nafion com contracorrente de azoto, controlada por um rotâmetro, entre as colunas de pré-concentração e o sensor. As membranas de Nafion permitem apenas a passagem da água por difusão para o exterior até que se atinja um equilíbrio, se o meio exterior é muito seco ou contem compostos muito higroscópios, permite que exista uma elevada percentagem de remoção de água do sistema.

O vinho foi alcalinizado antes de ser introduzido no sistema o que se traduzia na retenção de H<sub>2</sub>S e na imediata libertação do tiol para a corrente de azoto. Visto que os compostos são removidos do vinho em tempos distintos, o caudal é separado em duas correntes diferentes: uma que passa por coluna de pré-concentração com MS-5A para adsorção do EtSH, e outra que atravessa uma coluna de carvão activado refrigerado que adsorve o H<sub>2</sub>S. Na parte exterior das colunas de pré-concentração está enrolada uma resistência que aquece as colunas e permite a libertação dos analitos dos absorventes.

O sensor utilizado continha um cristal de 9 MHz com eléctrodos de ouro contido numa célula de PVC com o volume de 0,35 cm<sup>3</sup>. O cristal depois de revestido apresentou uma redução de frequência de 13 KHz Foi utilizado um frequencímetro Fluke PM6685 ligado a um oscilador que está também ligado aos eléctrodos da célula de PVC que contem o cristal. É utilizada uma fonte de alimentação de 5V. O equipamento utilizado está esquematizado na Figura 31

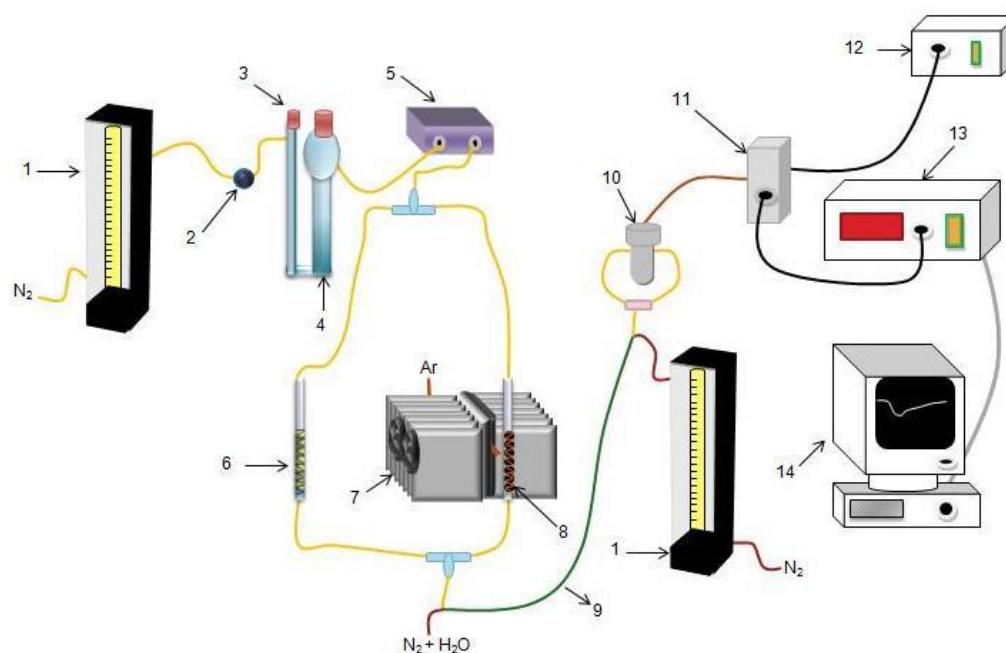


Figura 31- Montagem para pré-concentração e quantificação de  $\text{H}_2\text{S}$  e EtSH. 1- Rotâmetro, 2- Porta de injeção de gases, 3- Porta de injeção de líquidos, 4- Célula de vinho, 5- Caixa com membrana de Nafion e secantes, 6- Coluna de pré-concentração de EtSH, 7- Dispositivo Peltier, 8- Coluna de pré-concentração de  $\text{H}_2\text{S}$ , 9- Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 10- Célula de PVC com cristal, 11- Oscilador, 12- Fonte de alimentação de 5V, 13- Frequencímetro, 14- PC para aquisição de dados

O caudal utilizado neste sistema foi de 18 mL/min. O aquecimento das resistências é feito de forma individual, para não sobrecarregar o sistema eléctrico. O frequencímetro usado neste procedimento está directamente ligado ao PC, que possui um sistema de aquisição de dados que regista a frequência de segundo a segundo, o que possibilita a análise e tratamento de dados mais cuidadoso, facilita ainda a visualização a posteriori da dinâmica de absorção do analito ao sensor. A resposta é igualmente determinada, pela diferença entre a frequência da linha de base, e o mínimo atingido. À saída do sensor existe um borbulhador com hipoclorito que actua como retentor dos compostos, minimizando os maus odores.

### 7.2.3 Procedimento Experimental

Os padrões de  $\text{H}_2\text{S}$  são injectados pela porta de injeção de gases com seringas SGE, enquanto os padrões de EtSH com seringas para líquidos Hamilton através da porta de injeção para líquidos. Foi usado vinho sintético a pH 4 e vinho alcalinizado a pH 9 para



testar a eficiência na libertação e retenção dos analitos e dos interferentes. Depois de atravessar o vinho e uma caixa com membranas de Nafion e agentes secantes o EtSH é encaminhado para uma coluna de pré-concentração com MS-5A e o H<sub>2</sub>S para a coluna de carvão activado refrigerado pelo dispositivo de Peltier. Para que os compostos sejam libertados das colunas, é necessário aquecê-las a cerca de 200°C. Os analitos são depois encaminhados para a membrana de Nafion com contracorrente de azoto, para que seja removida a água, posteriormente são direccionados ao sensor, cujo o fluxo é dividido em duas correntes e é encaminhado ao centro do cristal. A resposta é medida entre o valor da linha de base e o mínimo de frequência. Para adquirir os dados para traçar as rectas de calibração, não se utilizam as colunas de pré-concentração, pois a sensibilidade e selectividade do sensor não dependem destas.

Foram testados 3 interferentes nesta quantificação: H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>.

#### 7.2.4 Resultados e Discussão

Para a quantificação de EtSH foram testados vinhos a diferentes pH: 4 e 9. O pH 4 é um valor médio de acidez que apresentam os vinhos comerciais, já o pH 9 foi testado, pois nestes valores o H<sub>2</sub>S fica retido e permite a separação dos compostos. Foi testada a dimensão da resposta para a injeção da mesma quantidade de composto.

A pH 4 para uma injeção de 5 µL de EtSH valor médio da resposta foi de 11±1Hz, já a pH 9 a resposta média determinada é de 9±1Hz. Visto que os limites de detecção que se encontram na literatura se encontravam distantes dos requisitos exigidos para a quantificação destes compostos, optou-se por efectuar a recta de calibração e a determinação de amostras sintéticas a pH 4, o que previsivelmente irá incrementar a sensibilidade do método.

O sensor apresenta uma sensibilidade de 3,75 Hz/mg, e apresenta um limite de detecção de 0,53mg e limite de quantificação de 1,06 mg. A gama linear de respostas situa-se entre 0,84 e 8,4mg e está representada na Figura 32.

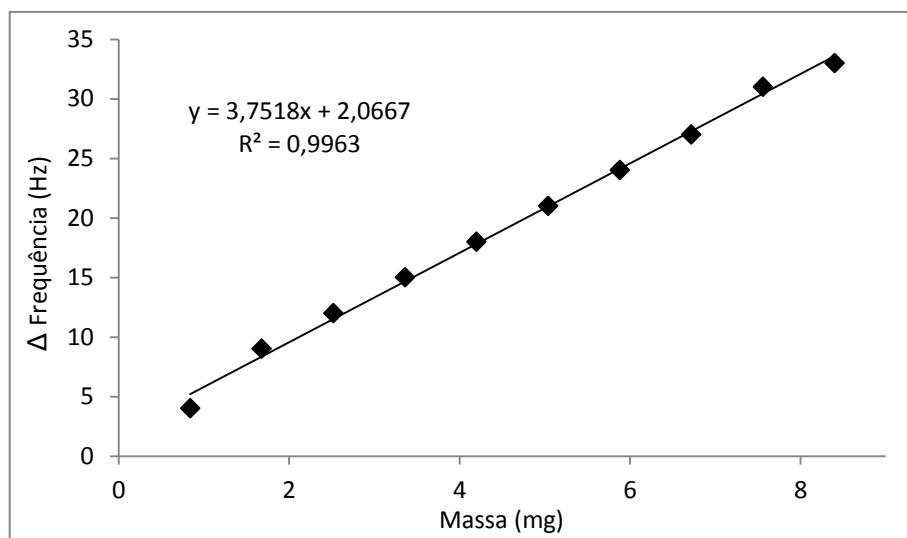


Figura 32- Recta de calibração para EtSH

Como seria expectável, a pH ácido, o limite de detecção é ligeiramente menor e a sensibilidade do sensor maior em relação à metodologia da secção 7.1. No entanto ainda se encontram muito distantes do necessário para quantificar o teor do EtSH no vinho.

Em seguida foi testada a pré-concentração e a posterior quantificação do EtSH, o que não se conseguiu, pois os peneiros absorvem muita água durante o processo de pré-concentração, que se liberta durante o processo de aquecimento, e os sinais do tiol e da água sobrepõem-se tornando impossível a quantificação do composto. A membrana de Nafion que existe à entrada do sensor, não remove toda a água do sistema. Para que exista pré concentração de EtSH é necessário rever o processo de eliminação de água do sistema, ou a utilização de um cristal não revestido, que minimiza os efeitos da humidade no sistema.

A determinação de H<sub>2</sub>S neste sistema também não demonstrou ser viável, pois os interferentes presentes não eram eficientemente eliminados. Foram injectados padrões puros de CO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub> através das portas de injeção para gases, que foram retidos no vinho alcalinizado, tal como o H<sub>2</sub>S. Após a injeção de ácido ao sistema o CO<sub>2</sub> atravessa a coluna de carvão activado como seria expectável, mas o SO<sub>2</sub> é retido, e o sinal de resposta sobrepõem-se ao do H<sub>2</sub>S, não permitindo a análise eficaz deste composto. Na impossibilidade de testar os peneiros MS-3A Rb<sup>+</sup> por não existirem em laboratório, foram efectuados diversos testes, onde foi determinado que quantidades muito superiores às existentes em 10 mL de vinho de SO<sub>2</sub> e de EtSH, são retidos numa coluna de 0,5 mm de diâmetro interno com cerca de 5 cm de carvão activado granulado à temperatura ambiente, mas não o H<sub>2</sub>S que se liberta de forma lenta a esta temperatura. Foi também

comprovado que à temperatura ambiente o carvão activado absorve pouca água, mas refrigerado a uma temperatura de aproximadamente 0°C, ela seria retida, provavelmente devido a condensação.

### **7.2.5 Conclusão**

O sistema testado não aparenta ser funcional para a quantificação dos analitos no sistema. As colunas de pré-concentração absorvem não só os analitos de interesse mas também alguns dos interferentes. No entanto, o principal interferente do sistema, o CO<sub>2</sub>, foi eliminado eficazmente, mas persiste a interferência do SO<sub>2</sub> e da água.

O sistema continua selectivo e eficiente na quantificação de EtSH, se não for pré-concentrado, no entanto, permanece pouco sensível. Alterações no sistema de aquisição, com equipamento já existente no laboratório, poderão otimizar esta sensibilidade.

Quanto ao H<sub>2</sub>S permanece inviável a sua determinação, pois os interferentes continuam a afectar imenso o sistema. O SO<sub>2</sub> e a água ficam retidos nas colunas de pré-concentração, sendo inviável a sua quantificação mesmo em amostras sintéticas. Sem as colunas de pré-concentração o sinal do CO<sub>2</sub> sobrepõe-se ao do H<sub>2</sub>S, impossibilitando a sua quantificação nas amostras.

## **7.3 Análise de H<sub>2</sub>S e EtSH em amostras de vinho sintético com dois sensores em série**

### **7.3.1 Introdução**

Um único sensor para a quantificação dos dois compostos não demonstrou ser viável no trabalho prático realizado. Isto porque, por um lado a transformação de H<sub>2</sub>S em tiol, para quantificação num cristal não revestido implica medidas especiais de segurança. E por outro a quantificação do tiol num cristal revestido com TEA aparenta demasiados problemas, principalmente no que diz respeito à humidade no sistema. Devido a estes problemas, optou-se pela utilização de dois sensores diferentes montados em série para quantificar os compostos individualmente. Tal como foi anteriormente provado, o H<sub>2</sub>S não interagia com um sensor cujo cristal com eléctrodos de ouro não se encontrasse revestido, e por isso decidiu-se usar um cristal não revestido para detectar o EtSH. O H<sub>2</sub>S

será detectado num cristal revestido com TEA, mas também o EtSH podia ser detectado neste sensor.

Para que esta metodologia seja funcional, é necessário quantificar primeiro o tiol, retê-lo num composto que não adsorva o H<sub>2</sub>S e detectar este último composto num segundo sensor. Esta nova metodologia permite minimizar a interferência da água na quantificação do EtSH, uma vez que a interferência é menor num cristal não revestido do que no cristal revestido com TEA.

Foi necessário incluir uma coluna de retenção de carvão activado à temperatura ambiente para reter o tiol e simultaneamente remover o SO<sub>2</sub> do sistema, permitindo a passagem do H<sub>2</sub>S que é concentrado numa segunda coluna de carvão activado refrigerada pelo dispositivo de Peltier.

Para a leitura da frequência em simultâneo nos dois sensores, foi utilizado um sistema já existente em laboratório, criado para ser utilizado num nariz electrónico, que permite a leitura da frequência de vários sensores em simultâneo e o armazenamento em intervalos de um segundo com uma resolução de 0,1 Hz. Os osciladores, fonte, e programa de aquisição foram desenvolvidos e optimizados anteriormente em laboratório [55]. Este novo equipamento, ao reduzir o ruído, permite aumentar a sensibilidade da técnica, e consequentemente obter limites de detecção mais baixos.

### 7.3.2 Equipamento

O sistema possui dois rotâmetros, um para controlar o caudal do sistema, outro para o fluxo de azoto na membrana de Nafion. Os padrões de EtSH eram diluídos em etanol e injectados através da bureta automática directamente na célula de vinho. Depois da célula de vinho e da caixa com membrana de Nafion com agentes secantes, existia a coluna de pré-concentração com MS-5A para concentrar o EtSH e o sensor com cristal não revestido. Segue-se uma coluna de carvão activado que visa reter o SO<sub>2</sub> e o tiol, e em seguida a coluna de pré-concentração de H<sub>2</sub>S refrigerada pelo sistema de Peltier. À saída desta coluna existe um tubo de teflon com cerca de 60 cm de comprimento, para que o gás que sai da coluna arrefeça até à temperatura ambiente antes de entrar na membrana de Nafion com contracorrente de azoto, para secar o gás. A corrente gasosa chega finalmente ao segundo sensor onde à saída existe um borbulhador com uma solução de hipoclorito que retém os compostos, minimizando os maus odores.

Os sensores utilizados possuíam cristais de 9 MHz com eléctrodos de ouro, cada um deles alojado numa célula de PVC com o volume de 0,35 cm<sup>3</sup>. O cristal revestido com TEA, depois de seco, apresentava um decréscimo de frequência de 19 KHz.

Os sinais foram obtidos por uma placa acoplada a um sistema Counter/Timer Device PXI-6608 que estava ligada a um painel BNC 2121 que permite a leitura de 8 sensores em simultâneo. Esta placa PXI-6608 estava ligada a um computador com um programa criado em LabView que permite ler e registar as frequências a cada segundo, com uma precisão de 0,1 Hz. Foi utilizada uma fonte de 9V estabilizada por um semiconductor regulador da tensão eléctrica que fornece uma voltagem muito estável de 5V. Este regulador de voltagem está ligado a uma placa que permite a distribuição desta voltagem a um máximo de dez osciladores, sendo que apenas dois deles foram utilizados.

O sistema eléctrico permite o aquecimento individual de cada uma das três colunas, ou o aquecimento simultâneo das duas colunas de carvão para limpeza rápida do sistema.

Na Figura 33 apresenta-se um esquema do arranjo experimental

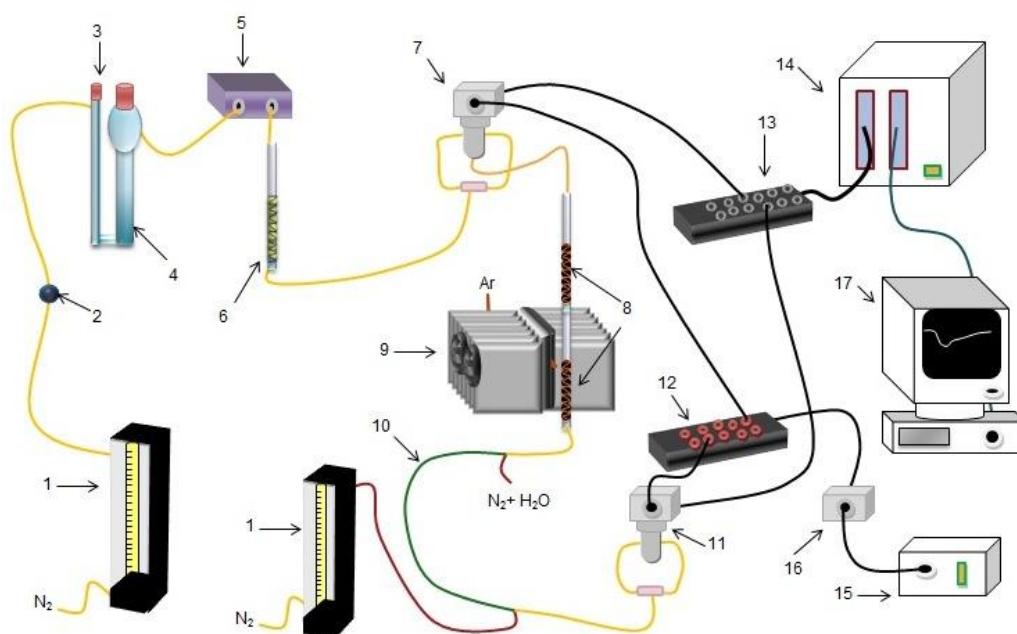


Figura 33- Montagem experimental com dois sensores em série: 1- Rotâmetro, 2- Porta de injeção para gases, 3- Porta de injeção para líquidos, 4- Célula de vinho, 5- Caixa com membrana de Nafion, 6- Coluna de pré-concentração com MS-5A, 7- Sensor 1, 8- Colunas de carvão activado, 9- Dispositivo Peltier, 10- Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 11- Sensor 2, 12- Placa para distribuição de voltagem, 13- Painel BNC 2121, 14- Counter/Timer Device PXI-6608, 15- Fonte de 9V, 16- Regulador de voltagem, 17- PC

### 7.3.3 Procedimento Experimental

As amostras eram injectadas na célula de vinho e percorreram o sistema até a coluna de pré-concentração de MS-5A onde os dois analitos ficam retidos. Iniciou-se então o arrefecimento da segunda coluna de carvão activado para que o H<sub>2</sub>S fique retido nesta após se libertar da coluna com MS-5A. De seguida inicia-se o aquecimento da coluna com MS-5A e obtém-se a resposta para o EtSH no sensor com cristal não revestido. O EtSH e o SO<sub>2</sub> das amostras ficam retidos na primeira coluna de carvão, e o H<sub>2</sub>S fica retido na segunda coluna de carvão refrigerada. O CO<sub>2</sub> não fica retido em nenhuma destas, e é eliminado do sistema. De seguida, inicia-se o aquecimento da segunda coluna de carvão activado para que se liberte o H<sub>2</sub>S e seja quantificado no segundo sensor. Por último, as 2 colunas de carvão activado são ligadas simultaneamente para limpeza do sistema só depois se poderia proceder a nova injeção.

Devido ao material existente não permitir o aquecimento e arrefecimento simultâneo das colunas, optou-se por testar o sistema começando por quantificar os compostos separadamente.

Para obter uma recta de calibração para os padrões de tiol, a coluna de pré-concentração para o EtSH permanece vazia, diminuindo o tempo necessário entre cada injeção, bem como reduzir a interferência da humidade no sistema. Já as amostras necessitam de ser pré-concentradas na coluna. Nestes testes o cristal utilizado não era o mesmo que foi utilizado nas metodologias anteriores, pois estava danificado.

Tal como foi anteriormente referido para o caso do EtSH, para obter a recta de calibração para o H<sub>2</sub>S não foi feita nenhuma pré-concentração. As colunas de MS-5A e de carvão activado refrigerada permanecem por isso vazias, para reduzir os tempos entre injeções e minimizar as interferências de humidade. Para as amostras, apenas a coluna de MS-5A foi removida.

Em todos os testes foi usado vinho sintético a pH 4

### 7.3.4 Resultados e Discussão

Foi primeiramente testada a possível interferência resultante da alteração do teor em etanol com as sucessivas adições dos padrões alcoólicos de EtSH, onde foi provado que não existe alteração na dimensão e na duração da resposta.

A gama de respostas lineares situa-se entre 0,31 e 15,3 mg e está representada na Figura 34

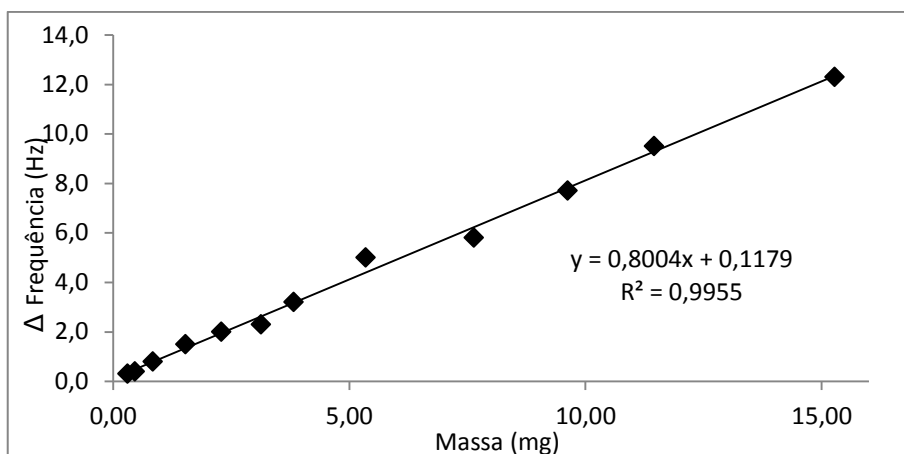


Figura 34- Recta de calibração para EtSH

A sensibilidade do sensor é de 0,80 Hz/mg e os limites de detecção e quantificação são de 1,03 e 2,06 mg, respectivamente. Ao contrário do que era expectável para esta metodologia, a sensibilidade do método em comparação com as metodologias anteriormente descritas, foi menor e o limite de detecção ligeiramente superior. Tal facto deve-se à menor sensibilidade do cristal para este analito. Cristais não revestidos utilizados para a quantificação de tióis, podem variar a sua sensibilidade por diversos factores entre eles conta-se a área superficial, que varia com o tamanho do eléctrodo e/ou a sua rugosidade.

Na análise das amostras a pré-concentração deste analito demonstrou novamente não ser eficaz. Embora um cristal não revestido seja menos sensível à humidade, os MS-5A são extremamente higroscópicos e absorvem toda a água que sai do sistema, que se liberta quando são aquecidos e condensa na superfície mais fria do cristal. As respostas obtidas eram extremamente longas e absurdamente grandes, devido à água. Comprova-se assim que é muito difícil pré-concentrar este composto quando presente em amostras líquidas. Foram também testados os peneiros do tipo 13X nesta metodologia, mas a humidade interferia no sistema de forma semelhante. Visto que o carvão activado retém o EtSH à temperatura ambiente, também foi testado como potencial adsorvente a ser usada na coluna de pré-concentração. Foram testados 2 tipos de carvão: granulado e em pó. No carvão granulado a libertação do EtSH demonstra ser muito lenta, e como se trata de um composto que apresenta interações muito rápidas e fracas com o ouro, a resposta diminui de intensidade e torna-se arrastada, o que diminui drasticamente a sensibilidade do método. O carvão em pó quando sujeito a variações de temperatura, provoca oscilações no caudal do sistema, que por vezes é mesmo interrompido, não sendo detectada qualquer resposta nestes casos.

O revestimento de TEA aplicado ao segundo sensor para detecção de H<sub>2</sub>S, continuou a demonstrar imensas interferências quanto ao elevado teor de água existente no sistema. Foram testados vários tipos de peneiros moleculares para eliminar a humidade, como MS 3A, 4A e 5A, em vários locais do sistema sendo que todos eles eliminam ou minimizam o sinal de resposta do H<sub>2</sub>S, devido a adsorção. Foram também testadas colunas de cloreto de cálcio, mas ao fim de poucas horas a água presente nestas colunas permite alguma dissolução do H<sub>2</sub>S e a respectiva diminuição da resposta. As membranas de Nafion eliminam eficazmente grande parte da água, mas neste caso não foram suficientes para eliminar toda a interferência, embora se possa assumir que se fossem adicionadas mais membranas, ou membranas mais compridas ao sistema, a percentagem de remoção de água seria maior. Uma outra metodologia que poderia ser utilizada é a inclusão de peneiros MS-3A Rb<sup>+</sup> que já demonstraram ser eficientes na remoção do SO<sub>2</sub> e poderiam absorver grande parte da água que existe no sistema antes de chegar as colunas de pré-concentração, caso estes peneiros moleculares absorvesse o EtSH poderiam ser usados na posição da primeira coluna de carvão.

Também com esta metodologia é impraticável quantificar e pré-concentrar o composto, para atingir os limites de detecção exigidos.

São necessários novos métodos de secagem. Para provar que a metodologia funciona e que o único problema está efectivamente na secagem dos gases, fizeram-se experiências de detecção de EtSH e H<sub>2</sub>S em amostras não aquosas.

### **7.3.5 Teste à eficiência da pré-concentração do H<sub>2</sub>S e EtSH**

#### **7.3.5.1 Introdução**

De modo a comprovar que a pré-concentração dos compostos seria viável, optou-se por analisar os dois compostos, utilizando apenas os padrões, sem qualquer tipo de amostra líquida. Deste modo clarifica-se que as interferências do sistema anterior se devem apenas a elevada humidade existente proveniente do vinho sintético, bem como à sensibilidade dos dois sensores anteriormente testados.



### 7.3.5.2 Sensor para EtSH

Anteriormente foi provado que o EtSH existente numa amostra líquida podia ser eficientemente quantificada [39], apesar dos limites de detecção terem sido elevados.

Para validar o método de pré-concentração, fizeram-se testes de recuperação, ou seja, determinou-se a percentagem de analito recuperado após a pré-concentração da amostra. Depois deste cálculo procede-se a um teste de significância para determinar a exactidão dos resultados.

#### 7.3.5.2.1 Equipamento

Para maior simplicidade, removeu-se a parte do sistema correspondente a detecção de H<sub>2</sub>S durante a análise do tiol. Uma vez que o gás de arraste (N<sub>2</sub> N50) percorria um longo tubo de PVC até chegar ao sistema, decidiu-se adicionar à saída do rotâmetro uma célula com uma mistura de MS 5A e 13X, para remover o máximo de água e outros interferentes que possam eventualmente existir na corrente de azoto.

Foi acrescentado outra destas colunas com mistura de peneiros moleculares para purificar o N<sub>2</sub> N50 que circula no exterior da membrana de Nafion

O esquema da montagem está representado na Figura 35.

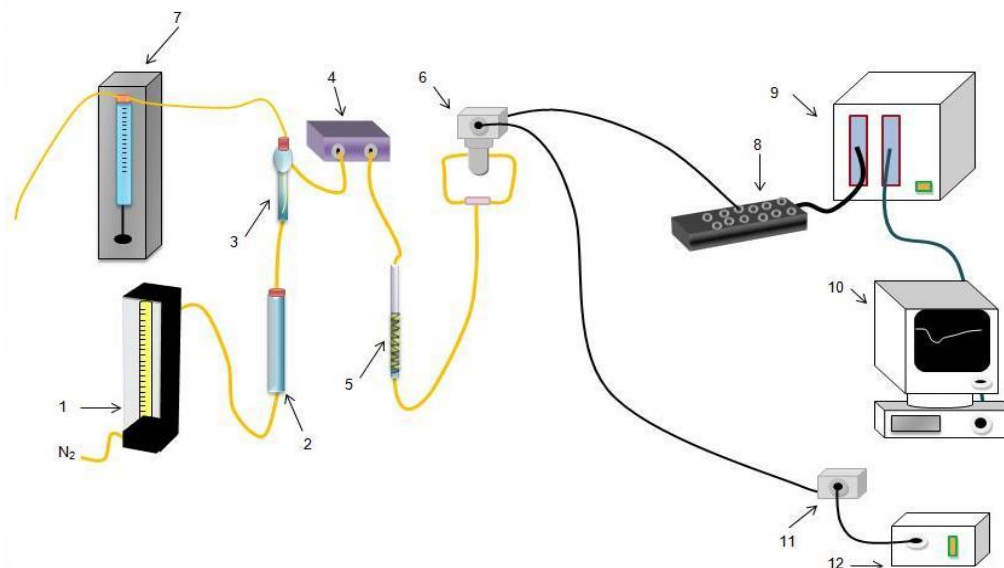


Figura 35- Montagem experimental para quantificação de EtSH: 1- Rotâmetro, 2- Célula com agentes peneiros, 3- Porta de injeção para líquidos, 4- Caixa com membrana de Nafion, 5- Coluna de pré-concentração com MS-5A, 6- Sensor 1, 7- Bureta automática, 8- Pannel BNC 2121, 9- Counter/Timer Device PXI-6608, 10- PC, 11- Regulador de voltagem, 12- Fonte de 9V

Neste procedimento, optou-se pelo uso de um cristal piezoeléctrico de 9 MHz com nanopartículas de ouro existente no laboratório. Este cristal pode apresentar mais pontos de ligação com os grupos tiol, e aumentar a sensibilidade da técnica.

### 7.3.5.2.2 Procedimento Experimental

São injectados com a bureta automática, na porta de injeção de líquidos diversos padrões de EtSH, para a construir uma recta de calibração e a resposta é medida entre a linha de base e o mínimo de frequência. Esta recta de calibração foi construída removendo a coluna de pré-concentração, mas garantindo que o caudal utilizado foi de 22 mL/min.

A pré-concentração do EtSH é realizada injectando 3 volumes com espaçamento de 90 segundos entre cada injeção, com a coluna à temperatura ambiente. Depois de 180 segundos após a última injeção, inicia-se o aquecimento e regista-se a resposta. Este procedimento é realizado cinco vezes.

### 7.3.5.2.3 Resultados e Discussão

A quantificação do EtSH é efectuada com eficiência. Embora o cristal apresente durante todo o procedimento elevada estabilidade, apresenta uma curta gama linear, ente 229 e 2600 µg, representado na Figura 36.

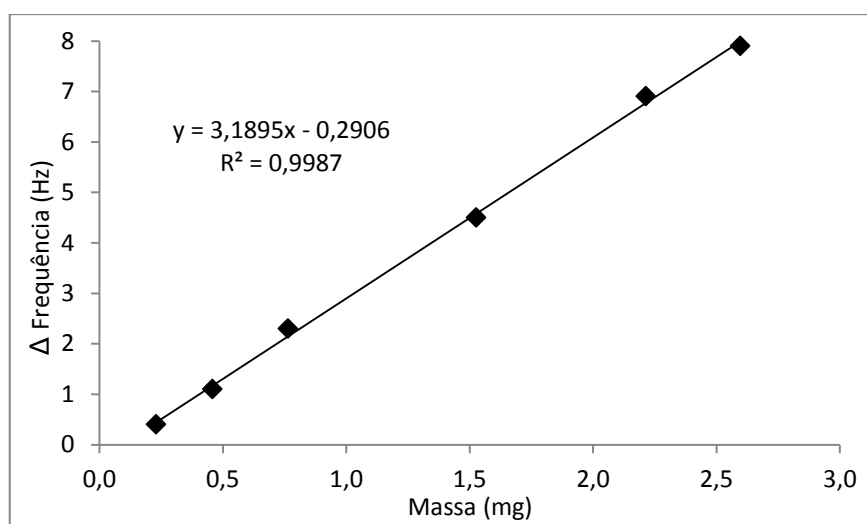


Figura 36- recta de calibração para EtSH

A sensibilidade do sensor é de 3,19 Hz/mg e o limite de detecção e de quantificação é de 557 e 869 µg. A sensibilidade e o limite de detecção do sensor não foram melhores do que as que se conseguiu com as metodologias anteriores em que se usou apenas um sensor, o que comprova a baixa sensibilidade do método para este analito. O facto de o teor médio deste composto no vinho ser 10,8 µg/L faz com que os volumes de amostra que se teria de introduzir no sistema sejam incompatíveis (50 L).

Importa no entanto validar o método de pré-concentração que se desenvolveu neste trabalho. Os volumes de solução alcoólica de EtSH (1/11) injectados, respostas e percentagem de recuperação estão expressos na Tabela 2

Tabela 2- Percentagem de recuperação nos testes de pré-concentração

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
Volume injeção 1 (µL)	6	6	6	7	7
Volume injeção 2 (µL)	7	6	6	7	7
Volume injeção 3 (µL)	5	5	4	5	5
Volume total solução (µL)	18	17	16	19	19
Volume total EtSH (µL)	1,64	1,55	1,45	1,73	1,73
Massa EtSH (mg)	1,37	1,30	1,22	1,45	1,45
Resposta (Hz)	4,6	4	3,8	4,6	4,7
% de recuperação	112	104	105	106	107

De seguida efectuou-se um teste de significância para verificar a exactidão dos resultados. O t calculado é de 3,27 que é superior ao t tabelado (2,57) [39], logo não se pode afirmar que os resultados obtidos sejam exactos, para um grau de confiança de 95%. A falta de exactidão do método pode dever-se à absorção de alguma água por parte dos peneiros que é detectada no cristal.

Foram injectados padrões puros de etanol, mas não se verificou qualquer resposta.

### 7.3.5.3 Sensor para H<sub>2</sub>S

#### 7.3.5.3.1 Equipamento

Para simplificar a análise, a parte do sistema correspondente à detecção do tiol da Figura 33 foi removida. Para a análise de H<sub>2</sub>S aumentou-se o tubo de Teflon à saída da

coluna para cerca de 1,5 metros de comprimento, que depois de ter sido enrolado em serpentina foi mergulhado num banho de água, para que fosse mantida a temperatura a que o gás chega ao cristal. O esquema está representado na Figura 37.

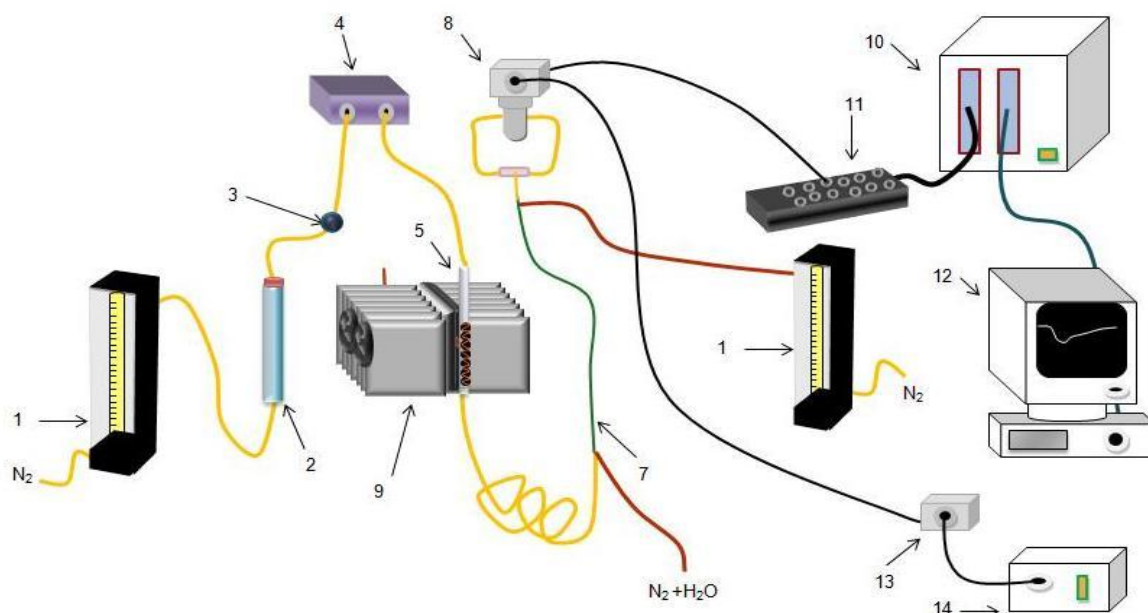


Figura 37- Rotâmetro, 2-Celula de secagem, 3- Porta de injeção de gases, 4- Caixa com membrana de Nafion, 5-Coluna de pré-concentração com carvão activado, 7- Membrana de Nafion com contracorrente de azoto, 8- Sensor, 9- Dispositivo de Peltier, 10- Counter/Timer Device PXI-6608, 11- Painel BNC 2121, 12- PC, 13- Regulador de voltagem, 14- Fonte de 9V

O cristal de quartzo com eléctrodos de ouro de 9 MHz, foi revestido com uma quantidade de TEA que originou uma redução de frequência de 15 KHz. O caudal utilizado foi de 12 mL/min.

### 7.3.5.3.2 Procedimento Experimental

Os padrões de H<sub>2</sub>S são injectados pela porta de injeção para gases, e atingem o cristal originando uma resposta por parte do sensor. Foram injectados volumes entre 10 e 500 µL do gás do saco, previamente padronizado, para obter uma recta de calibração.

Foi testada a pré-concentração da amostra para verificar a viabilidade da técnica na quantificação deste composto no vinho. Diluiu-se 30 vezes o gás do saco previamente utilizado, e foram injectadas 5 amostras com o valor médio de H<sub>2</sub>S presente em 10 mL de vinho, cerca de 160 ng de composto.

### 7.3.5.3.3 Resultados e Discussão

Foram injectados diversos padrões de concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>S, a partir de um saco de concentração 247 ppm. A gama linear de respostas situa-se entre 2,47 e 74,1 µg de H<sub>2</sub>S e está representada na Figura 38

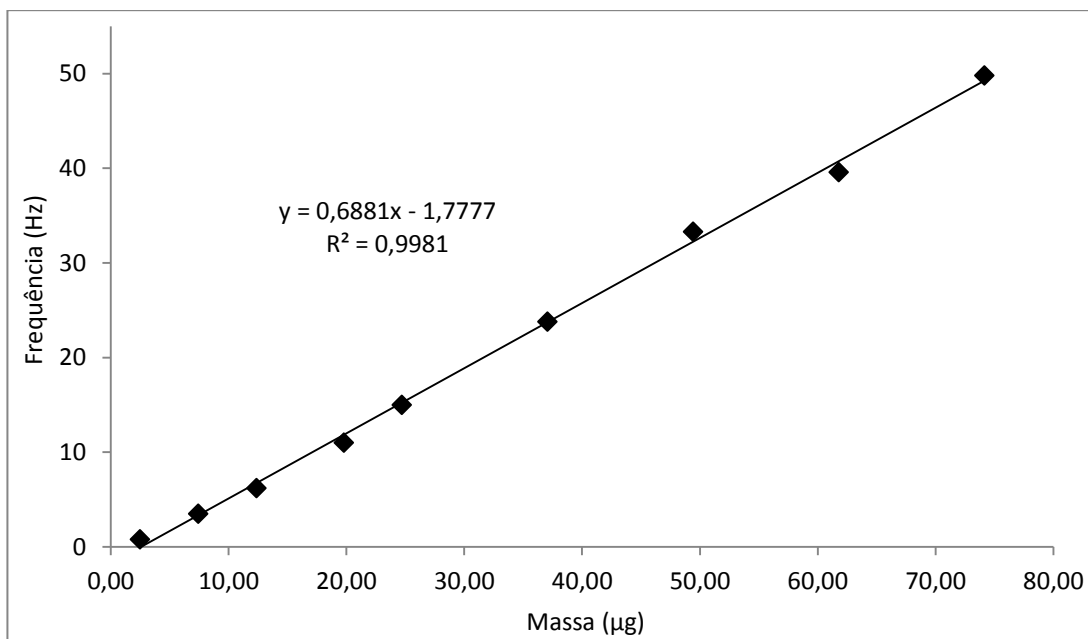


Figura 38- Recta de calibração para H<sub>2</sub>S

A sensibilidade do método é de 0,69 Hz/µg sendo o limite de detecção de 1,9 µg e o de quantificação de 8,5 µg. Em relação aos resultados obtidos em trabalhos anteriores [39] para a quantificação deste composto no vinho o limite de detecção baixa mais de 300%.

Como já foi descrito, este composto existe no vinho com maus aromas em concentrações médias de 16,3 ppb, portanto para atingir os limites de detecção seriam necessários cerca de 120 mL de vinho.

A pré-concentração continua a mostrar-se uma técnica essencial para a detecção de H<sub>2</sub>S pois a injeção de 120 mL de vinho provocaria arrastamento nas respostas, pela dificuldade em remover todo o composto num curto espaço de tempo, mas recorrendo a pré-concentração este problema é minimizado, pois o carvão pode adsorver o analito durante o tempo necessário, ou então proceder à adição de várias aliquotas de volumes inferiores, ficando o analito retido no carvão refrigerado. É importante referir que a humidade do sistema aumentaria, e que seriam necessária a aplicação de métodos para a eliminar.

Para verificar a viabilidade da pré-concentração, foram injectados padrões diluídos com aproximadamente 20 µg de H<sub>2</sub>S, o que deveria originar respostas na ordem dos 11Hz.

Foram visualizados 2 sinais não sobrepostos, um de cerca de 110 Hz que corresponde ao H<sub>2</sub>S e outra resposta de dimensões variáveis correspondente previsivelmente à água que é acumulada no carvão, e que não foi removida pelos agentes secantes do sistema.

A forma do sinal analítico está representada na Figura 39.

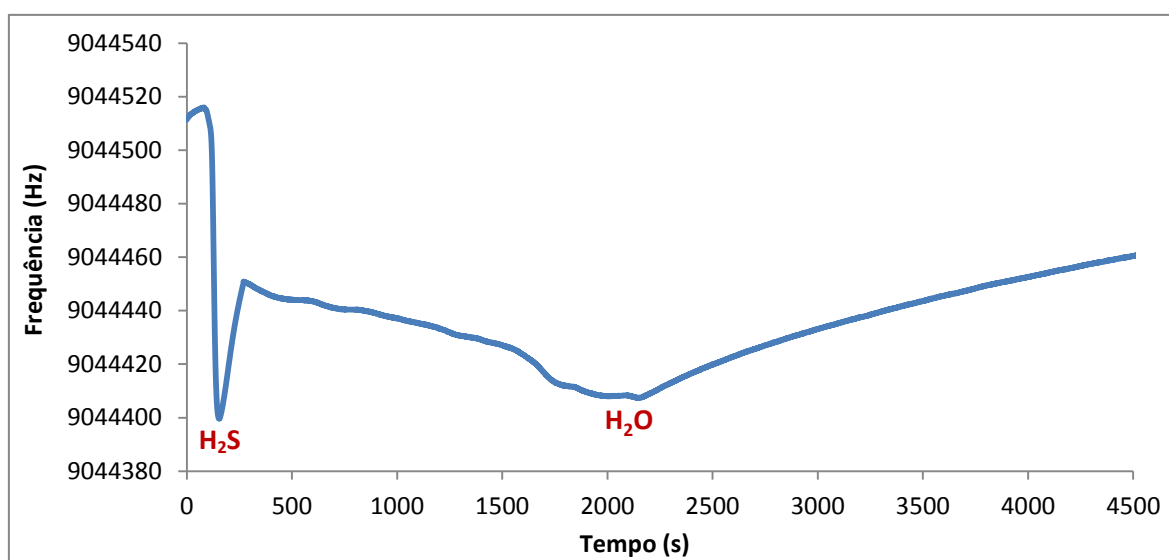


Figura 39- Forma do sinal analítico para detecção de H<sub>2</sub>S (cerca de 20 µg) usando pré-concentração

O procedimento foi repetido várias vezes com respostas sempre idênticas. Foram também realizados ensaios em branco, com injeção sem analito, onde apenas se encontra uma resposta (segundo sinal).

Este facto permite concluir que a pré-concentração das amostras influencia de facto a sensibilidade do sistema analítico, exigindo que a calibração seja feita com padrões diluídos que passem pela coluna de pré-concentração. A calibração neste caso seria demorada e inviável, pois a elevada humidade a que o cristal estaria sujeito e a perda de revestimento por dissolução alterariam a sensibilidade do sistema ao longo das várias horas necessárias para produzir uma recta de calibração.

Na impossibilidade de realizar uma recta de calibração recorrendo a padrões gasosos diluídos de H<sub>2</sub>S, optou-se por apenas provar que é possível detectar a média de massas de H<sub>2</sub>S presentes em 10 mL de vinho, ou seja, detectar cerca de 160 ng de H<sub>2</sub>S. Foram injectados 164 ng de H<sub>2</sub>S retirando o volume de 20 µL do saco com o padrão de

H<sub>2</sub>S anteriormente preparado. Este procedimento foi repetido 5 vezes. As respostas para as 5 injeções estão representadas na Tabela 3 e na Figura 40 pode ver-se a forma de um dos sinais obtidos com uma das injeções.

Tabela 3- Respostas a uma injeção de 164ng de H<sub>2</sub>S

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
18,4 Hz	16,9 Hz	16,5 Hz	13,4 Hz	12,5 Hz

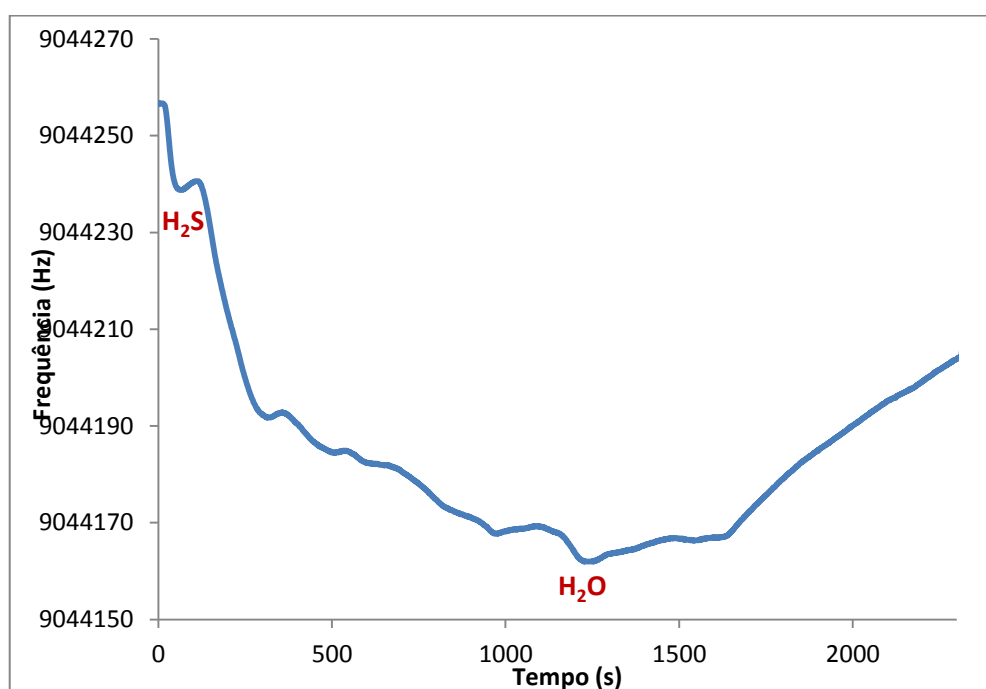


Figura 40- Forma do sinal analítico para detecção de H<sub>2</sub>S (164 ng) usando pré-concentração

A diminuição constante na frequência observada ao longo do tempo, deve-se provavelmente a perdas do analito do saco de diluição. No entanto estes sinais comprovam que a pré-concentração de H<sub>2</sub>S no carvão é eficaz tornando possível detectar o sinal de H<sub>2</sub>S presente em apenas 10 mL, e que em amostras gasosas a separação entre o sinal do H<sub>2</sub>S e da água é eficiente.

### 7.3.6 Conclusões

De modo a provar que a água proveniente das amostras é o único interferente que não permite analisar e quantificar o teor dos analitos em amostras gasosas foi efectuada

a análise de amostras gasosas de H<sub>2</sub>S e EtSH, provando-se a viabilidade do métodos e a eficiência da pré-concentração.

Para a análise de EtSH foram obtidos os limites de detecção e quantificação semelhantes aos obtidos nas metodologias anteriores o que confirma a baixa sensibilidade do método para a análise de EtSH em amostras de vinho pois seriam necessários cerca de 50 L de vinho para atingir o limite de detecção que foi determinado (557 µg). A pré-concentração do composto em peneiros moleculares do tipo 5A permite a detecção do EtSH mas não demonstrou ser uma metodologia exacta, provavelmente porque os peneiros ainda absorvem alguma água que entra no sistema e que condensa a superfície do cristal.

Para o H<sub>2</sub>S foram obtidos limites de detecção baixos, que permitem detectar quantidades do analito na ordem dos 1,9 µg. Esta metodologia diminui em cerca de 300% o limite de detecção descrito para a análise de H<sub>2</sub>S em vinho por QCM [39]. A pré-concentração do composto permite detectar a quantidade de H<sub>2</sub>S existente em 10 mL de vinho, porque a sensibilidade do método é alterada quando existe pré-concentração, no entanto é inviável a quantificação das amostras, pois a calibração do método recorrendo a pré-concentração é demorada e portanto inexequível.

A metodologia testada para amostras líquidas num sistema com dois sensores em série, demonstra não ser funcional para a quantificação de EtSH e H<sub>2</sub>S.

Para o EtSH o limite de detecção e a sensibilidade do método foram piores do que os que se obtiveram nas metodologias anteriores devido a utilização de um cristal diferente dos usados anteriormente que apresentava menor sensibilidade. No entanto foi possível verificar que o valor inferior da gama linear é menor, devido a injeção de menores volumes com a bureta automática e também ao novo sistema de aquisição de dados que aumenta a resolução do sistema. A pré-concentração de EtSH em amostras aquosas continua a não ser viável devido a elevada absorção de água por parte dos peneiros, que se liberta durante o aquecimento, e condensa na superfície do cristal.

Para a análise de H<sub>2</sub>S, a humidade continuou a ser um interferente de difícil eliminação, pois um cristal revestido com TEA demonstra ser muito sensível para a água, não havendo mais meios no laboratório para a eliminar, sem que fosse também eliminado o H<sub>2</sub>S.



## 8. CONCLUSÃO

---



Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um sistema experimental que visa quantificar o  $\text{H}_2\text{S}$  e o EtSH em amostra de vinho com microbalanças de cristais de quartzo.

Para que esta quantificação seja válida é necessário que a técnica utilizada seja sensível a concentrações destes compostos na ordem dos ppb.

A utilização de um sensor com um cristal não revestido para quantificar tióis, apresenta problemas na transformação do  $\text{H}_2\text{S}$  em tiol devido a interferência do metanol e à elevada toxicidade de outros reagentes que poderiam ser utilizados sob medidas especiais de segurança.

Um sensor com um cristal revestido com TEA não permite a eliminação dos principais interferentes encontrados em amostras de vinho e devido à elevada sensibilidade do sensor à humidade não foi possível verificar a viabilidade da pré-concentração dos compostos.

Na utilização de dois sensores em série, um com cristal não revestido para detecção do EtSH e um segundo com um cristal revestido com TEA para análise de  $\text{H}_2\text{S}$ , não permitiu quantificar os dois compostos, devido à humidade que interfere na detecção dos compostos e impossibilita a pré-concentração. Dai que tivessem sido realizados ensaios em amostras gasosas, de modo a verificar a viabilidade da metodologia proposta e a eficiência da pré-concentração.

Para o  $\text{H}_2\text{S}$  obteve-se um limite de detecção de  $1,9 \mu\text{g}$ , no entanto seriam necessários cerca de 120 mL de amostras de vinho para ter tal quantidade de composto. A pré-concentração altera a gama linear de repostas, permitindo a detecção de 164 ng do composto, o que corresponde a 10 mL de vinho, tornando a técnica viável para utilização, no caso de existirem meios de secagem mais robustos e eficientes.

Para o EtSH em amostras gasosas obteve-se um limite de detecção de  $557 \mu\text{g}$ , o que torna a técnica pouco atractiva para amostras de vinho, pois para atingir estes valores seriam necessários cerca de 50 L de amostra. É possível detectar este composto após a sua pré-concentração, no entanto a metodologia não apresenta boa exactidão.



## 9. BIBLIOGRAFIA

---



- [1] Jacobson J.L. Introduction to wine laboratory practices and procedures. New York, N.Y.: Springer; 2006. xvii, 375 p.
- [2] Machado H. O vinho na economia Portuguesa: alguns aspectos. Serviço de Estudos Económicos Banco Nacional Ultramarino 1966; Boletim Trimestral 68. Disponível em: <http://memoria-africa.ua.pt>; Acedido a 26 de Setembro de 2011
- [3] Boulton R.B. Principles and practices of winemaking. New York: Chapman & Hall; 1996. xiv, 604 p.
- [4] Ribéreau-Gayon P. Handbook of enology. Chichester: John Wiley & Sons; 2000. XI, 454 p.
- [5] Moreira N., De Pinho P.G., Santos C., Vasconcelos I. Volatile sulphur compounds composition of monovarietal white wines. Food Chem. 2010;123(4):1198-203.
- [6] Jackson R. Wine Science: Principles and Applications (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2008.
- [7] Lea A.G.H., Piggott J.R. Fermented beverage production. London: Blackie Academic & Professional; 1995. XVI, 428 p.
- [8] Macneil K. The wine bible. New York: Workman Pub.; 2001. xvii, 910 p.
- [9] Catarino S., Pinto D., Curvelo-Garcia A.S. Validação e Comparação de Métodos de Análise em Espectrofotometria de Absorção Atómica com Chama Para Doseamento de Cobre e Ferro em Vinhos e Aguardentes. Ciência Téc Vitiv. 2003;18:65-76.
- [10] Fang Y., Qian M.C. Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. J Chromatogr A. 2005;1080(2):177-85.
- [11] Johnson H. Vintage : the story of wine. New York: Simon and Schuster; 1989. 480 p.
- [12] Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2005. 1 v. (various pagings)
- [13] Beckett F., Pescada A. Vinho e os seus estilos, Caminho, 2007, 304 p.
- [14] Santos J.Q. Fertilizantes: fundamentos e aspectos práticos da sua aplicação: Publicações Europa-América; 1983.
- [15] Rizzon L.A. Sistema de Produção. Embrapa Uva e Vinho Tinto; 2006. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br>; Acedido a 26 de Setembro de 2011
- [16] Moreira N., De Pinho P.G., Santos C., Vasconcelos I. Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. Food Chem. 2011;126(4):1599-607.
- [17] Silva H.B. O vinho aspectos gerais. Lisboa: Ciência e Vida; 1981. 87 p.
- [18] Izquierdo Cañas P.M., García Romero E., Gómez Alonso S., Palop Herreros M.L.L. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. J Food Compos Anal. 2008;21(8):724-30.
- [19] Rauhut D. O carácter redutor dos vinhos: O impacto das fermentações alcoólica e maloláctica no conteúdo em compostos voláteis de enxofre do vinho. Geisenheim, Germany 2009. Disponível em: <http://www.enartis.com.pt/download/Rauhut.pdf>; Acedido a 26 de Setembro de 2011
- [20] Alcaide-Hidalgo J.M., Moreno-Arribas M.V., Polo M.C., Pueyo E. Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and ageing with lees. Food Chem. 2008;107(2):622-30.

- [21] Lopez R., Lapena A.C., Cacho J., Ferreira V. Quantitative determination of wine highly volatile sulfur compounds by using automated headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection - Critical study and optimization of a new procedure. *J Chromatogr A*. 2007;1143(1-2):8-15.
- [22] Kirk R.E., Othmer D.F. *Encyclopedia of chemical technology*. 5th ed ed. Boston: John Wiley; 2007. 27 vol.
- [23] Carey F.A. *Organic chemistry*. 3rd ed ed. New York (NY): McGraw-Hill; 1996. XXXII, 1269p.
- [24] Moreira N., Mendes F., Pereira O., Guedes De Pinho P., Hogg T., Vasconcelos I. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Anal Chim Acta*. 2002;458(1):157-67.
- [25] Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer; 2009. xv, 735 p.
- [26] Zoecklein B.W. *Wine analysis and production*. New York: Chapman & Hall; 1995. xviii, 621 p.
- [27] Dias J.P.S. Curso Intensivo de Conservação, Estabilização e Engarrafamento. Estação Vitivinícola Bairrada. Disponível em: <http://www.drapc.min-agricultura.pt/home.php>; Acedido a 28 de Novembro de 2011
- [28] Tamasi G., Pagni D., Carapelli C., Justice N.B., Cini R. Investigation on possible relationships between the content of sulfate and selected metals in Chianti wines. *J Food Compos Anal*. 2010;23(4):333-9.
- [29] Li H., Guo A., Wang H. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem*. 2008;108(1):1-13.
- [30] Provenzano M.R., El Bilali H., Simeone V., Baser N., Mondelli D., Cesari G. Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chem*. 2010;122(4):1338-43.
- [31] Regulamento (CE) Nº1493/1999 da comissão Europeia de 17 de Maio de 1999, Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:179:0001:0084:PT:PDF>; Acedido a 26 de Setembro de 2011
- [32] Regulamento (CE) Nº423/2008 da Comissão Europeia de 8 de Maio de 2008, Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:127:0013:0013:PT:PDF>; Acedido a 26 de Setembro de 2011
- [33] Benitez P., Castro R., Barroso C.G. Removal of iron, copper and manganese from white wines through ion exchange techniques: effects on their organoleptic characteristics and susceptibility to browning. *Anal Chim Acta*. 2002;458(1):197-202.
- [34] Hulanicki A., Glab S., Ingman F. *Chemical Sensors Definitions and Classification*. *Pure Appl Chem*. 1991;63(9):1247-50.
- [35] Buck R.P., Lindner E., Kutner W., Inzelt G. Piezoelectric chemical sensors - (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2004;76(6):1139-60.
- [36] Buttry D.A., Ward M.D. Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Chem Rev*. 1992;92(6):1355-79.
- [37] Mason W.P. *Piezoelectric crystals and their application to ultrasonics*. New York,: Van Nostrand; 1950. xi, 508 p.



- [38] O'sullivan C.K., Guilbault G.G. Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications. *Biosens Bioelectron.* 1999;14(8-9):663-70.
- [39] Monteiro F.J.D. Desenvolvimento de sensores para a determinação de H<sub>2</sub>S e CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SH no vinho. Aveiro: F. Monteiro; Tese de mestrado da Universidade de Aveiro, 2010. XIV, 68 p.
- [40] Wu D.H., Tsai Y.J., Yen Y.T. Robust design of quartz crystal microbalance using finite element and Taguchi method. *Sensor Actuat B-Chem.* 2003;92(3):337-44.
- [41] Rocha T.a.P., Gomes M.T.S.R., Duarte A.C., Oliveira J.a.B.P. Quartz crystal microbalance with gold electrodes as a sensor for monitoring gas-phase adsorption/desorption of short chain alkylthiol and alkyl sulfides. *Anal Commun.* 1998;35(12):415-6.
- [42] Yurish S.Y., Gomes M.T.S.R. Smart sensors and MEMS : [proceedings of the NATO Advanced Study Institute on smart sensors and MEMS, Povia de Varzim, Portugal, 8-19 September 2003]. Dordrecht ; Boston: Kluwer Academic; 2004. xv, 480 p.
- [43] Hlavay J., Guilbault G.G. Applications of Piezoelectric Crystal Detector in Analytical-Chemistry. *Anal Chem.* 1977;49(13):1890-8.
- [44] Gomes M.T., Duarte A.C., Oliveira J.P. Comparison of two methods for coating piezoelectric crystals. *Anal Chim Acta.* 1995;300(1-3):329-34.
- [45] Ferreira V., Mateo-Vivaracho L., Cacho J. Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography-negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. *J Chromatogr A.* 2007;1146(2):242-50.
- [46] Qian M.C., Fang Y. Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. *J Chromatogr A.* 2005;1080(2):177-85.
- [47] Rauhut D., Kurbel H., Macnamara K., Grossmann M. Headspace GC-SCD monitoring of low volatile sulfur compounds during fermentation and in wine. *Analysis.* 1998;26(3):142-5.
- [48] Guasch J., Mestres M., Busto O. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J Chromatogr A.* 2000;881(1-2):569-81.
- [49] Nedjma M., Maujean A. Improved Chromatographic Analysis of Volatile Sulfur-Compounds by the Static Headspace Technique on Water-Alcohol Solutions and Brandies with Chemiluminescence Detection. *J Chromatogr A.* 1995;704(2):495-502.
- [50] Mestres M., Busto O., Gausch J. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma. *J Chromatogr A.* 1998;808(1-2):211-8.
- [51] Webber L.M., Hlavay J., Guilbault G.G. Piezoelectric Detectors for Specific Detection of Environmental Pollutants. *Mikrochim Acta.* 1978;1(3-4):351-8.
- [52] Valcarcel M., Palenzuela B., Simonet B.M., Rios A. Determination of free and total sulphur dioxide in wine by use of an amalgamated piezoelectric sensor. *Anal Chim Acta.* 2005;535(1-2):65-72.
- [53] De Andrade J.F., Suleiman A.A., Guilbault G.G. A coated piezoelectric crystal detector for the determination of hydrogen sulfide. *Anal Chim Acta.* 1989;217(0):187-92.
- [54] Gomes M.T.S.R., Nogueira P.S.T., Oliveira J.a.B.P. Quantification of CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and H<sub>2</sub>S with a single coated piezoelectric quartz crystal. *Sensor Actuat B-Chem.* 2000;68(1-3):218-22.

- [55] Gornes M.T.S.R., Fernandes D.L.A., Rolo T.A., Oliveira J.a.B.P. A new analytical system, based on an acoustic wave sensor, for halitosis evaluation. *Sensor Actuat B-Chem.* 2009;136(1):73-9.
- [56] Galipeau J.D., Falconer R.S., Vetelino J.F., Caron J.J., Wittman E.L., Schweyer M.G., Andle J.C. Theory, Design and Operation of a Surface-Acoustic-Wave Hydrogen-Sulfide Microsensor. *Sensor Actuat B-Chem.* 1995; 24(1-3):49-53.
- [57] Fernandes D.L.A. Nariz electrónico para aplicações ambientais, alimentares e clínicas. Aveiro: D. Fernandes; Tese de douturamento da Universidade de Aveiro, 2008. XXV, 138 p.
- [58] Mendham J., Afonso J.C., Denney R.C., Barnes J.D., Thomas M.J.K. *VOGEL – Análise química quantitativa*: LTC; 2002.
- [59] Activated Alumina & Molecular Sieves: Quality and advanced technology - Procatalyse Catalysts & Adsorbents. In: *Technologies A-IG*, editor.: OT Production; 2002. Disponível em: [http://www.axens.net/pdf/products/Axens\\_adsorbents.pdf](http://www.axens.net/pdf/products/Axens_adsorbents.pdf); Acedido a 28 de Novembro de 2011
- [60] Disponível em: [http://www.eletrodomesticosforum.com/efeito\\_peltier.htm](http://www.eletrodomesticosforum.com/efeito_peltier.htm); Acedido a 26 de Setembro de 2011
- [61] Steinberg D.S. *Cooling techniques for electronic equipment*. 2nd ed. New York: Wiley; 1991. 483 p.
- [62] Paskach T.J., Schrader G.L., Mccarley R.E. Synthesis of methanethiol from methanol over reduced molybdenum sulfide catalysts based on the Mo<sub>6</sub>S<sub>8</sub> cluster. *J Catal.* 2002;211(2):285-95.